

ANA SOFIA MOURÃO SIMÕES

**ESTUDO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *BRUCELLA*
*SUIS***

Orientadora: Doutora Maria Inácia Corrêa de Sá

Co-orientadora: Prof. Doutora Margarida Alves

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

**Lisboa
2013**

ANA SOFIA MOURÃO SIMÕES

**ESTUDO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *BRUCELLA*
*SUIS***

**Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária, no curso de
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
conferido pela Universidade Lusófona de
Humanidades e Tecnologias.**

**Orientadora: Doutora Maria Inácia Corrêa de Sá
Co-orientadora: Prof. Doutora Margarida Alves**

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

**Lisboa
2013**

Agradecimentos

A autora gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram, de alguma forma, para a concretização deste trabalho.

À Direção do ex-Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (atualmente Unidade Estratégica de Produção e Saúde Animal do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.), por permitir a realização do meu estágio curricular e as condições necessárias para a sua realização.

À minha orientadora científica, Doutora Maria Inácia Corrêa de Sá, agradeço a amabilidade com que me recebeu, o apoio e a disponibilização dos meios bibliográficos para a realização deste trabalho, assim como a incansável partilha de conhecimentos científicos e orientação.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Margarida Alves, agradeço toda a sua simpatia, disponibilidade, interesse e incentivo demonstrados durante toda a realização do estágio e elaboração deste trabalho.

À Dr^a Lurdes Clemente, a minha gratidão pela sua disponibilidade e prontidão na resposta às minhas dúvidas, bem como a partilha de conhecimentos, indispensáveis para a concretização do presente trabalho.

À Eng^a Ana Cristina Ferreira, agradeço a amizade e paciência demonstradas e a importante partilha de conhecimentos e experiência ao longo da realização do estágio;

Às técnicas auxiliares do serviço de Brucelose, Alice Geraldês, Cristina Ferreira e Fátima Custódio, os meus agradecimentos por toda a simpatia com que me receberam, pela amizade demonstrada e pela transmissão de conhecimentos e experiência.

À professora Ana Lúcia Rodrigues, agradeço toda a sua amizade, interesse e incentivo demonstrados, ao longo dos vários anos de curso.

Por fim, aos meus pais, a minha profunda gratidão, por todo o amor e apoio incondicional ao longo de todos estes anos. À Andreia, à Susana, à Raquel e especialmente ao Hugo, pelo apoio, carinho e amizade com que me brindaram ao longo de todo o meu percurso.

Estudo da susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes de *Brucella suis*

RESUMO

A brucelose é uma zoonose de distribuição mundial e representa um importante problema de saúde pública em muitos países em desenvolvimento. Preocupante é, também, a emergência da resistência bacteriana aos antimicrobianos, a nível mundial. Do nosso conhecimento, em Portugal, não existem estudos publicados sobre a susceptibilidade *in vitro* de *Brucella* spp a antimicrobianos.

O presente estudo teve como objectivo a avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos de *Brucella suis* e sua comparação com estirpes de *Brucella melitensis* e *Brucella abortus*. Para tal, foi determinada em 89 estirpes bacterianas (75 de *B. suis*, 11 de *B. melitensis* e 3 de *B. abortus*) a Concentração Mínima Inibitória para a tetraciclina, doxiciclina, estreptomicina, gentamicina, trimetoprim, sulfametoxazol, rifampicina e polimixina-B. A maioria das estirpes em estudo mostrou ser suscetível à tetraciclina, doxiciclina, gentamicina, estreptomicina e rifampicina. Detectaram-se diferenças significativas na susceptibilidade entre as várias espécies e biovars à polimixina-B. Uma estirpe de campo de *B. suis* biovar 2 revelou um comportamento atípico em relação à estreptomicina, gentamicina e rifampicina. Sugere-se, como trabalho futuro, o estudo mais aprofundado desta estirpe, a nível molecular, para detecção de genes responsáveis pelo seu comportamento face aos antimicrobianos em questão.

Os resultados obtidos poderão servir como base de dados e de comparação por parte de outros autores, em estudos futuros.

Palavras-chave: Brucelose, *Brucella suis*, Antimicrobianos, Susceptibilidade bacteriana, Concentração Mínima Inibitória.

A study of antimicrobial susceptibility of *Brucella suis* isolates

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonosis with a worldwide distribution and represents an important issue of public health in some developing countries. The emergence of bacterial resistance to antimicrobials is also of great concern. To our knowledge, in Portugal, there are no published studies about the *in vitro* susceptibility of *Brucella* spp to antimicrobials.

The aim of the present study was the evaluation of antimicrobial susceptibility of *Brucella suis* strains and its comparison to strains of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus*. The Minimal Inhibitory Concentration was determined for a total of 89 *Brucella* strains (75 *B. suis*, 11 *B. melitensis* and 3 *B. abortus* strains) to tetracycline, doxycycline, streptomycin, gentamicin, trimetoprim, sulfamethoxazol, rifampicin and polymyxin-B. In this study, most strains were susceptible to tetracycline, doxycycline, streptomycin, gentamicin and rifampicin. Significant differences were found in susceptibility between species and biovars to polymyxin-B. One isolate of *B. suis* biovar 2 showed an atypical behavior to streptomycin, gentamicin and rifampicin. Further studies are suggested, towards the investigation of this isolate, at a molecular level, in order to detect the encoding genes responsible for this antimicrobial phenotype.

The results obtained will be available for consultation and comparison by other authors, in future studies.

Key-words: Brucellosis, *Brucella suis*, Antimicrobial, Bacterial susceptibility, Minimal Inhibitory Concentration.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

30S – subunidade ribossómica 30S

ATCC – “American Type Culture Collection”

CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CMI – Concentração Mínima Inibitória

EFSA – “European Food Safety Authority” (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)

ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (Ensaio imunoenzimático)

et al. – E outros

FAO – “Food and Agriculture Organization” (Organização Mundial de Agricultura e Alimentação)

INIAV I.P. - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

L - litro

LPS – Lipopolissacárido

mg - miligrama

ml - mililitro

mRNA – “messenger Ribonucleic Acid” (Ácido ribonucleico mensageiro)

OIE – “World Organisation for Animal Health” (Organização Mundial de Saúde Animal)

OMS – Organização Mundial de Saúde

RNA – “Ribonucleic acid” (Ácido ribonucleico)

rRNA – “Ribosomal ribonucleic acid” (Ácido ribonucleico ribossómico)

UE – União Europeia

Ufc – Unidades formadoras de colónias

µg – micrograma

µl - microlitro

ÍNDICE GERAL

1. Introdução	10
1.1 O Género <i>Brucella</i>	12
1.1.1 Taxonomia	12
1.1.2 A Bactéria	13
1.2 Epidemiologia	15
1.3 Patogénese, Sintomatologia clínica e Diagnóstico	16
1.4 Profilaxias Médica e Sanitária	18
1.5 Tratamento	19
1.5.1 Brucelose humana	19
1.5.2 Brucelose animal	20
1.6 Agentes Antimicrobianos	22
1.6.1 Tetraciclina	23
1.6.2 Aminoglicosídeos	24
1.6.3 Sulfonamidas e Trimetoprim	25
1.6.4 Rifampicina	25
1.6.5 Polimixinas	26
1.7 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos	28
1.7.1 Concentração Mínima Inibitória	28
1.7.2 Categorias de interpretação	29
1.7.3 Métodos de diluição	29
1.7.3.1 Diluição em agar	30
1.7.3.2 Diluição em caldo (Macro e microdiluição)	30
1.7.4 E-test®	31
1.7.5 Métodos moleculares	32

2. Material e Métodos	34
2.1 Estirpes bacterianas	34
2.2 Determinação da susceptibilidade de <i>Brucella suis</i> a antimicrobianos ...	36
2.2.1 Técnica de diluição em agar Mueller-Hinton	36
3. Resultados	39
4. Discussão	44
5. Conclusão	49
6. Bibliografia	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura e características do género <i>Brucella</i>	14
Tabela 2. Estirpes de <i>Brucella</i> em estudo no ensaio da determinação da susceptibilidade a antimicrobianos	35
Tabela 3. Critérios de interpretação da CMI de <i>Brucella</i> spp, para as tetraciclinas e para os aminoglicosídeos	38
Tabela 4. Valores de CMI ₅₀ e CMI ₉₀ para as estirpes de campo de <i>B. suis</i> biovar 1, biovar 2 e biovar 4 e CMI das estirpes de referência de <i>B. suis</i> (biovars 1 a 5)	41
Tabela 5. Valores da CMI para as estirpes de campo de <i>B. melitensis</i> biovar 1, biovar 3 e das estirpes de referência de <i>B. melitensis</i> (biovars 1 a 3)	42
Tabela 6. Valores da CMI das estirpes de referência de <i>B. abortus</i> (biovars 1 a 3)	43
Tabela 7. Número de ocorrências para determinada CMI das estirpes de campo de <i>B. suis</i> biovar 2	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do invólucro celular de <i>Brucella</i> spp.	15
Figura 2: Teste de susceptibilidade de estirpes de <i>B. suis</i> à Polimixina-B por diluição em agar Mueller-Hinton	30
Figura 3: E-test®	32

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma das doenças zoonóticas mais disseminada a nível mundial, (Pappas *et al.*, 2006; Solera, 2010), sendo responsável por consideráveis perdas económicas, bem como por uma elevada morbilidade humana em áreas endémicas (Pappas *et al.*, 2006; Nicoletti, 2010). A brucelose humana caracteriza-se por uma infeção severa e debilitante, frequentemente crónica, cujo tratamento consiste na administração de antimicrobianos, que evitem complicações e recidivas (Godfroid *et al.*, 2011). Nos animais de produção, é responsável por abortos, infertilidade e perdas significativas de produção (Nicoletti, 2010).

Três das 10 espécies de *Brucella* atualmente conhecidas são as mais disseminadas a nível mundial e responsáveis pelo maior número de casos humanos: *Brucella melitensis*, dos ovinos e caprinos, *Brucella abortus* dos bovinos e *Brucella suis*, dos suínos (Solera, 2010; Godfroid *et al.*, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda, para o tratamento da brucelose humana, a combinação de dois ou mais agentes antimicrobianos por um período mínimo de seis semanas, dependendo da localização da infeção e da sintomatologia clínica associada. Na prática clínica, a resistência antimicrobiana é pouco frequente, mas é comum a ocorrência de recidivas (Organização Mundial de Saúde [OMS], 2011).

Nos anos 40, a introdução de agentes antimicrobianos no tratamento de doenças infecciosas revolucionou a medicina. Infelizmente, a sua utilização resultou no desenvolvimento e disseminação de resistências, levando a falhas terapêuticas, ao aumento da morbilidade e da mortalidade, com os consequentes custos adicionais para a sociedade (OMS, 2011).

A disseminação de bactérias patogénicas, resistentes a vários antimicrobianos, foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde, pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, do inglês “World Organisation for Animal Health”) e pela Organização Mundial de Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês “Food and Agriculture Organization”) como um problema grave para a saúde humana e animal.

A Organização Mundial de Saúde reconhece, também, que a utilização massiva destes agentes, em animais de produção, tenha contribuído ativamente para este problema de saúde pública, pois promove o desenvolvimento de resistências, com provável transmissão de genes de resistência ao Homem (OMS, 2011).

De facto, o desenvolvimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos, é, atualmente, uma situação problemática e em crescimento exponencial, devido ao aparecimento de fenótipos de resistência que ocorrem em muitas bactérias patogénicas e comensais. Esta situação leva os clínicos a depender da informação fornecida pelos testes de susceptibilidade antimicrobiana, realizados *in vitro*, sublinhando a importância dos laboratórios de diagnóstico na prática clínica (“World Organisation for Animal Health” [OIE], 2012c).

Existem vários métodos para determinação da susceptibilidade bacteriana a antimicrobianos. A sua seleção baseia-se em vários fatores, nomeadamente a praticabilidade, a flexibilidade, a automatização, o custo, a reprodutibilidade, a eficácia e a preferência individual. Contudo, a padronização e a harmonização do método são fatores imprescindíveis para a comparação dos dados obtidos nos programas de vigilância/monitorização entre os vários países (OIE, 2012c).

1.1 O Género *Brucella*

1.1.1 Taxonomia

As bactérias do género *Brucella* são parasitas intracelulares facultativos que infetam uma larga variedade de mamíferos domésticos, selvagens e o Homem (OIE, 2012a). O género *Brucella* pertence à família *Brucellaceae*, ordem *Rhizobiales*, classe *alpha-proteobacteria* (Audic *et al.*, 2009; Ficht, 2010; Godfroid *et al.*, 2011). Com base na sequência da subunidade 16S do ácido ribonucleico ribossómico (rRNA, do inglês Ribosomal ribonucleic acid), estas bactérias incluem-se na subclasse α -2 das *Proteobacteria*, juntamente com organismos do solo (género *Ochrobactrum*), simbiontes de plantas (género *Rhizobium*), agentes patogénicos de plantas (género *Agrobacterium*) e parasitas intracelulares de animais (géneros *Bartonella* e *Rickettsia*) (Banai & Corbel, 2010; Ficht, 2010). O género *Ochrobactrum* pode ocasionalmente infetar o Homem e foi identificado como filogeneticamente mais próximo do género *Brucella* (Godfroid *et al.*, 2011).

Atualmente estão reconhecidas 10 espécies no género *Brucella* (Tabela 1) (Nicoletti, 2010). Seis são designadas clássicas, com base nas características fenotípicas, na patogenicidade e no hospedeiro preferencial: *Brucella melitensis*, o agente da brucelose ovina e caprina; *Brucella abortus*, o agente da brucelose bovina; *Brucella suis*, o agente da brucelose suína mas também de lebres, renas e caribus; *Brucella neotomae* isolada de roedores selvagens e *Brucella ovis* e *Brucella canis*, responsáveis, respetivamente, pela epididimite do carneiro e pela brucelose canina. Em três destas espécies são reconhecidos diferentes biovars: *Brucella abortus* (1–6, 9), *Brucella melitensis* (1–3) and *Brucella suis* (1–5) (Pappas *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2008a; Godfroid *et al.*, 2011).

Nos últimos anos novas espécies têm vindo a ser reconhecidas. Em 1994, foram isoladas bactérias de cetáceos e focas que, em 2007, foram classificadas como *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis*, respetivamente (Foster *et al.*, 2007). Em 2001, isolou-se uma bactéria do rato-silvestre (*Microtus arvalis*) designada, em 2007, como *Brucella microti*, tendo também sido posteriormente isolada do solo e de linfonodos mandibulares da raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) na Áustria (Scholz *et al.*, 2008a; Scholz *et al.*, 2008b; Scholz *et al.*, 2009).

Mais recentemente foi identificada uma nova espécie, *Brucella inopinata*, associada a duas infeções atípicas de humanos (De BK *et al.* 2008; Scholz *et al.*, 2010; Tiller *et al.*

2010a). O reservatório natural desta última espécie é desconhecido. No futuro, novas espécies poderão vir a ser propostas, a partir de isolamentos recentes em babuínos e em roedores selvagens na Austrália (Schlabritz-Loutsevitch *et al.*, 2009; Tiller *et al.*; 2010b).

Na tabela 1 são mencionadas as várias espécies, biovars, hospedeiro, a primeira descrição e virulência para o Homem.

Tabela 1: Nomenclatura e características do género *Brucella*. (Adaptado de Pappas *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2010; Godfroid *et al.*, 2011)

Espécie	Biovar	Hospedeiro	Primeira descrição	Virulência para o Homem
<i>B. melitensis</i>	1-3	Ovinos, caprinos, camelídeos	Bruce, 1887	Elevada
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Bovinos, camelídeos, buffalos	Bang, 1897	Moderada a elevada
<i>B. suis</i>	1-5	Suínos (1-3), lebres (2), caribou e renas (4), roedores selvagens (5)	Traum, 1914	Elevada (1, 3, 4) Não patogénica (2, 5)
<i>B. canis</i>	-	Canídeos	Carmichael and Bruner, 1968	Moderada
<i>B. ovis</i>	-	Ovinos	Van Drimmelen, 1953	Não patogénica
<i>B. neotomae</i>	-	Roedores	Stoenner and Lackman, 1957	Baixa
<i>B. pinnipedialis</i> and <i>B. ceti</i>	-	Cetáceos, focas	Ewalt and Ross, 1994	Elevada
<i>B. microti</i>	-	Rato-silvestre	Scholz, 2001	Desconhecida
<i>B. inopinata</i>	-	Desconhecido	Scholz, 2010	Elevada

1.1.2 A Bactéria

Os organismos do género *Brucella* são cocobacilos Gram-negativos. O seu tamanho varia entre 0.6 a 1.5 µm de comprimento e 0.5 a 0.7 µm de largura. A morfologia destas bactérias é normalmente constante, sendo, no entanto, possível encontrar formas pleomórficas em culturas antigas. Não apresentam flagelos, cápsula ou formação de esporos e são imóveis. Embora não sejam verdadeiramente ácido-álcool resistentes, são resistentes à descoloração por ácidos fracos e coram de vermelho pelo método modificado de Ziehl-Neelsen (Alton *et al.*, 1988).

Estas bactérias possuem um invólucro celular, composto por membrana externa e membrana interna, que envolve o periplasma constituído por peptidoglicano e componentes solúveis. Os componentes mais importantes do invólucro celular de *Brucella* são o lipopolissacárido (LPS) e o hapteno nativo (um polissacárido secundário) (Moriyón & López-

Goñi, 1998). Para além destes compostos, existem também proteínas características (Cloeckaert *et al.*, 2002), fosfatidilcolina (um fosfolípido tipicamente eucariótico) e lípidos de ornitina (Moreno & Moriyón, 2002). Tal como noutras bactérias gram-negativas lisas, o LPS de *Brucella* é constituído por uma parte glucolipídica (Lípido A), inserida na membrana externa, e outra polissacarídica, dirigida para o exterior e que se divide em duas partes, o núcleo oligossacarídico, mais interno, e a cadeia-O polissacarídica, mais externa (figura 1) (Sá, 2009).

O LPS de *Brucella*, não endotóxico, possui uma estrutura pouco frequente em microrganismos patogénicos (Lapaque *et al.*, 2005) constituindo uma molécula chave na virulência desta bactéria (Sá, 2009). Esta molécula, atípica, confere resistência à ação bactericida do complemento e dos péptidos catiónicos do hospedeiro, induz uma resposta anómala e/ou reduzida por parte dos leucócitos e dos macrófagos, é extremamente resistente à degradação e modula a resposta imune do hospedeiro. Estas propriedades tornam o LPS um importante fator de virulência na sobrevivência e replicação destas bactérias no hospedeiro (Lapaque *et al.*, 2005; Sá, 2009).

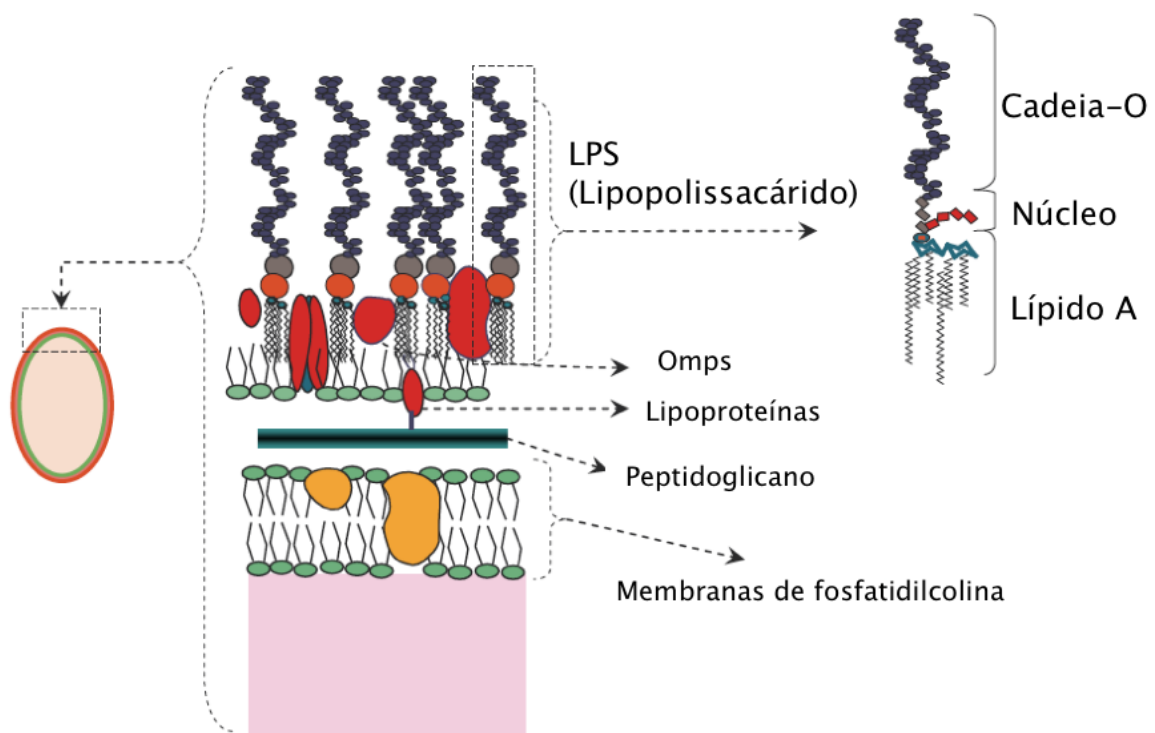


Figura 1: Representação esquemática do invólucro celular de *Brucella* spp.

Omps – “outer-membrane proteins” (proteínas da membrana externa).

(Adaptado de Raquel Conde, 2008)

Estas bactérias possuem, assim, a capacidade de invasão e sobrevivência em células fagocitárias e não fagocitárias, sendo os macrófagos, as células dendríticas e os trofoblastos os principais alvos. Embora mais de 90% das bactérias fagocitadas sejam destruídas após a fagocitose (Bargen *et al.*, 2012), um pequeno número escapa à destruição e atinge o retículo endoplasmático, onde estabelece um nicho de replicação, sem afetar a sobrevivência das células (Moreno & Gorvel, 2004; Xavier *et al.*, 2010; Bargen *et al.*, 2012).

1.2 Epidemiologia

A brucelose humana é uma das zoonoses bacterianas com distribuição mundial mais comum, mas ainda é um problema subestimado em algumas regiões. Esta doença é reconhecidamente endémica na bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente, Ásia Ocidental, África e América do Sul (Pappas *et al.*, 2006b). Em 2008, foram confirmados 619 casos de brucelose humana na União Europeia (UE). Considerando os países membros da UE, esta doença teve uma incidência mais elevada na Grécia, Itália, Portugal e Espanha, não oficialmente livres de brucelose bovina, ovina e caprina (“European Food Safety Authority” [EFSA], 2010). Em Portugal, desde 1999 tem vindo a verificar-se um decréscimo significativo na incidência anual de brucelose humana, sendo a prevalência atual de 8.5 casos por milhão de habitantes (Direcção Geral de Saúde, comunicação pessoal, 2012). Este decréscimo deve-se, sobretudo, à aplicação dos planos oficiais de controlo e erradicação da Brucelose ovina e bovina (Sá, comunicação pessoal, 2012).

Atualmente, apenas três espécies do género *Brucella* produzem um impacto significativo em saúde pública: *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* (Godfroid *et al.*, 2011). Os bovinos, ovinos, caprinos e suínos infectados são as principais fontes de infeção para o Homem (Godfroid *et al.*, 2011; OMS, 2006). A forma mais frequente de transmissão da brucelose ao Homem ocorre sobretudo através do consumo de produtos lácteos não pasteurizados, como o leite ou queijo, embora possa, também, ocorrer por contacto direto com tecidos de animais infetados (Pappas *et al.*, 2006a; Godfroid *et al.*, 2011). Em países indemnes, os casos de brucelose humana ocorrem esporadicamente em indivíduos que adquirem a infeção noutros países ou por importação ilegal de produtos de origem animal (Al Dahouk *et al.*, 2005; Al Dahouk *et al.*, 2007). No laboratório, é a infeção mais adquirida, a nível mundial, devido a más práticas laboratoriais (Pappas *et al.*, 2006a).

A espécie *B. melitensis*, normalmente associada aos pequenos ruminantes, é a mais virulenta e a mais frequentemente reportada e isolada nos casos de brucelose humana sobretudo nos países da bacia do Mediterrâneo, onde esta infeção é endémica (OMS, 2006; Godfroid *et al.*, 2011). A infeção por *B. abortus* é a mais disseminada, surgindo, frequentemente, sob forma sub-clínica e menos severa do que a causada por *B. melitensis* ou *B. suis*. A principal fonte desta infeção é o gado bovino, embora outros animais, como bisontes, camelídeos, canídeos e iaques sejam, também, importantes em certas regiões (OMS, 2006). Ocorre sobretudo em África e no Médio Oriente (Godfroid *et al.*, 2011).

A prevalência da infeção por *B. suis* em suínos é elevada na América do Sul e Sudoeste Asiático, tendo sido descrita na Europa em vários países, incluindo Portugal, onde a prevalência é mais elevada no interior Norte e Sul do país (EFSA, 2009; OIE, 2012b). Os biovars 1, 3 e 4 de *B. suis* são patogénicos para o Homem. A infeção pelo biovar 1 no Homem pode estar relacionada com a caça ou abate de suínos selvagens (Robson *et al.*, 1993; Starnes *et al.*, 2004), mas o gado bovino também é considerado uma importante fonte de infeção, devido à sua capacidade de colonização do úbere bovino (Corbel, 1997). *B. suis* biovar 4 é uma grave zoonose na região do Ártico (Forbes, 1991; OIE, 2012b). Na Europa, prevalece a infeção por *B. suis* biovar 2, não patogénica para o Homem. Esta espécie, possui uma estreita relação epidemiológica com a fauna silvestre, nomeadamente o javali (*Sus scrofa*) e a lebre europeia (*Lepus europaeus*), considerados reservatórios desta infeção e uma possível fonte de transmissão aos suínos domésticos explorados em regime extensivo (Garin-Bastuji *et al.*, 2000; Godfroid & Käsbohrer, 2002; Sá *et al.*, 2010).

1.3 Patogénese, Sintomatologia clínica e Diagnóstico

Como referido anteriormente, as bactérias são alvo de fagocitose e alcançam os linfonodos regionais, dando-se a sua disseminação por via sistémica até ao fígado, baço, glândulas mamárias e órgãos reprodutivos. A progressão da infeção para uma doença crónica, complicações ou recidivas, em animais ou humanos, está relacionada não só com a sua capacidade de sobrevivência e multiplicação por longos períodos de tempo no interior das células hospedeiras, como também com a sua capacidade de resistência à resposta imune do hospedeiro (Godfroid *et al.*, 2011; Martirosyan *et al.*, 2011).

Os animais, hospedeiros primários, infetam-se por ingestão, inalação ou inoculação conjuntival de partículas infecciosas e por contacto sexual. A transmissão da infeção é facilitada pela presença de uma elevada carga bacteriana presente nos fetos abortados, nos

corrimentos provenientes do trato reprodutivo e no leite. A inseminação artificial com sémen contaminado é também uma importante via de disseminação (OMS, 2006; OIE, 2012a).

Os sinais mais característicos, mas não específicos, são o aborto, nascimentos prematuros e retenção placentária. Existe, também, um decréscimo da produção leiteira, e a fertilidade é afetada. A maioria dos animais infetados aborta apenas uma vez. O úbere permanece infetado permanentemente, especialmente no caso de bovinos e caprinos, e a excreção da bactéria no leite é frequente. Nos ovinos machos, são frequentes as infeções localizadas, como orquite e/ou epididimite, no caso de infeção por *B. melitensis* e *B. ovis* (OMS, 2006). Outras complicações, como artrite, higromas, espondilite ou claudicação são frequentes na infeção por *B. suis* em suínos (Alton, 1990; OIE, 2012b).

No Homem, o período de incubação da brucelose varia entre algumas semanas a vários meses. A forma aguda da doença é caracterizada por sinais clínicos inespecíficos, consistentes com uma infeção sistémica: febre, fadiga, perda de peso, dores de cabeça, mialgia e sudorese. Outras manifestações clínicas incluem complicações osteoarticulares, gastrointestinais, respiratórias, cardiovasculares, desordens neurológicas, e, mais raramente, endocardite e neurobrucelose (Godfroid *et al.*, 2011).

O diagnóstico desta doença, em animais, é baseado não só nos sinais clínicos e epidemiológicos mas, sobretudo, nos resultados das provas laboratoriais (OMS, 2012a). As provas serológicas são as mais utilizadas, devido não só à sua exequibilidade, mas, também, porque permitem um diagnóstico rápido de um grande número de amostras. As provas mais utilizadas são a Aglutinação Rápida com o antígeno Rosa de Bengala, a Fixação do Complemento e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA, do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”). A interpretação dos resultados obtidos nestas provas deve ser efetuada em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos existentes e, sobretudo, com o diagnóstico bacteriológico, que se baseia no isolamento e identificação da bactéria (*in vivo* ou *post-mortem*) que, no caso de ser positivo, confirma de modo inequívoco a doença (EFSA, 2009; Sá *et al.*, 2010). Os métodos de diagnóstico molecular também são utilizados, sobretudo para caracterização da espécie e estudos epidemiológicos (Bricker, 2002; OMS, 2006; OIE, 2012a).

1.4 Profilaxias Médica e Sanitária

A prevenção da brucelose baseia-se, principalmente, na aplicação de medidas de biossegurança, por vezes de difícil aplicação (Sá *et al.*, 2010). Em muitas situações, não existe alternativa senão tentar minimizar o impacto desta doença e reduzir o risco de infeção por medidas de higiene pessoal, adoção de práticas seguras de trabalho, proteção do ambiente e higiene alimentar (OMS, 2006; Sá *et al.*, 2010).

Embora não existam vacinas aprovadas para uso humano (OMS, 2006), existem várias vacinas desenvolvidas para o controlo da brucelose animal: S19 e RB51, estirpes vacinais de *B. abortus*, usadas na imunização do gado bovino, e Rev1 de *B. melitensis*, administrada em ovinos e caprinos (Schurig *et al.*, 2002; Godfroid *et al.*, 2011). São vacinas vivas atenuadas, com um certo grau de virulência para os animais e para o Homem (Godfroid *et al.*, 2011; Sá, comunicação pessoal, 2011). Embora com limitações, a sua utilização tem tido sucesso no controlo da brucelose em alguns países desenvolvidos (Godfroid *et al.*, 2011).

A estirpes vacinais Rev1 e RB51 são resistentes à estreptomicina e à rifampicina, respetivamente, agentes antimicrobianos usados no tratamento da brucelose em humanos (Schurig *et al.*, 2002; Godfroid *et al.*, 2011). Adicionalmente, as estirpes S19 e Rev1 são lisas, pelo que a sua utilização pode causar dificuldades na distinção entre animais vacinados e infetados na interpretação dos testes serológicos (Godfroid *et al.*, 2011). Ao contrário das anteriores, a estirpe vacinal RB51, sendo rugosa, causa pouca interferência com as provas serológicas (Schurig *et al.*, 2002).

Atualmente não existem vacinas para a brucelose suína. A profilaxia sanitária assume, assim, grande importância, sendo que as medidas são aplicadas em função do sistema de manejo. Em suínos explorados em regime extensivo deve-se evitar o contacto com javalis, através da construção de cercas. Em explorações fechadas, deve ser evitada a introdução de fêmeas e varrascos sem conhecimento prévio do estatuto sanitário do efetivo de origem (Sá *et al.*, 2010). Acresce-se que a aplicação de uma estratégia de teste e abate é inviável, uma vez que as atuais provas de diagnóstico serológico, devido à falta de especificidade e sensibilidade, não podem ter uma interpretação individual (Sá, comunicação pessoal, 2012).

Em casos excecionais, com grande prevalência da infeção, aplica-se o vazio sanitário, com o abate da totalidade do efetivo, seguido de desinfeção, identificação e

eliminação da fonte de infecção e a reposição dos efectivos com novos animais livres de doença (EFSA, 2009).

1.5 Tratamento

1.5.1 Brucelose Humana

O tratamento da brucelose humana deve consistir na administração de antimicrobianos eficazes durante um período de tempo adequado. Nos pacientes com complicações, pode ser necessário efetuar um tratamento adicional ou intervenções cirúrgicas. Uma forma aguda e não complicada da doença é responsiva a um tratamento com antimicrobianos adequados, podendo-se alcançar uma recuperação clínica e bacteriológica completas. Uma grande variedade de agentes antimicrobianos possui actividade *in-vitro* contra este agente; no entanto, os resultados obtidos em testes de susceptibilidade nem sempre estão de acordo com a eficácia clínica (OMS, 2006). A monoterapia, para o tratamento da brucelose, tem sido considerada inadequada devido à inaceitável taxa de recidivas (Ariza *et al.*, 2007).

A Organização Mundial de Agricultura e Alimentação, em conjunto com a Organização Mundial de Saúde, elaboram, desde 1986, recomendações para o tratamento da brucelose (OMS, 1986). Atualmente, a OMS recomenda, no caso de brucelose não complicada, em adultos e crianças com mais de oito anos de idade, o uso de tetraciclina, via oral (500 mg, em intervalos de 6 horas, durante pelo menos 6 semanas) ou doxiciclina, igualmente por via oral (100 mg, em intervalos de doze horas, durante um período de 6 semanas) em associação com um aminoglicosídeo: estreptomicina (1 mg por dia, intramuscular, durante 2 a 3 semanas) ou gentamicina (5 mg/kg/dia, vias intravenosa ou intramuscular, durante 6 semanas). O tratamento com a associação da doxiciclina com a estreptomicina, nas doses acima indicadas, é considerado o “tratamento gold standard” no tratamento da brucelose não complicada (Ariza *et al.*, 2007).

Em formas complicadas, são necessárias condições especiais no tratamento, como o prolongamento da duração da terapêutica no caso de complicações osteoarticulares, a administração adicional de substâncias antimicrobianas capazes de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (rifampicina ou trimetoprim-sulfametoxazol), em complicações do sistema nervoso central ou, no caso de endocardite, a substituição cirúrgica de válvulas danificadas. Também em casos de gestação ou aleitamento e em crianças com menos de 8 anos,

existem alternativas de tratamento, devido à contra-indicação na administração de tetraciclina (OMS, 2006).

1.5.2 Brucelose Animal

O uso de agentes antimicrobianos no tratamento da brucelose animal é proibido. Contudo, existem alguns estudos de campo tendo como objetivos, entre outros, a viabilidade da sua utilização na diminuição da excreção e na minimização do impacto clínico.

No tratamento da brucelose em bovinos, foram utilizados, sem sucesso, vários agentes antimicrobianos, elementos químicos, minerais e vitaminas. No entanto, agentes como a estreptomicina ou tetraciclina, administrados em bovinos infectados com *B. abortus*, reduziram a ocorrência de abortos (Radwan *et al.*, 1992). Em bovinos naturalmente infectados com *B. melitensis* ou *B. abortus*, a combinação de oxitetraciclina de longa duração por via intramuscular (25 mg/kg, em intervalos de três dias, durante 42 dias) com estreptomicina, pela mesma via (25 mg/kg por dia, durante oito dias) e administração intramamária de oxitetraciclina (20 ml por teto, por dia, durante quatro dias) ou uma variação do mesmo tratamento, em que a estreptomicina seria administrada em intervalos de dois dias durante 16 dias, e a infusão intramamária também em intervalos de dois dias, durante oito dias, provaram ser igualmente eficazes na eliminação de *Brucella* spp. de todos os sujeitos (ausência da bactéria nas secreções do úbere e em tecidos selecionados à necrópsia) sem recidivas registradas (Radwan *et al.*, 1993).

Em ovinos, a administração de oxitetraciclina de longa duração, por via intramuscular (25 mg/kg, em intervalos de dois dias, durante quatro semanas) em combinação com estreptomicina, pela mesma via (20 mg/kg, em intervalos de dois dias, durante duas semanas) pode ser a terapêutica mais eficaz e menos dispendiosa na eliminação de *B. melitensis*, com ausência da bactéria nas secreções do úbere e em tecidos selecionados à necrópsia (Radwan *et al.*, 1992). Em carneiros infectados com *B. ovis*, com excreção da bactéria no sêmen e epididimite, uma terapêutica de oxitetraciclina de longa duração (durante 15 dias) combinada com estreptomicina (durante sete dias) reduziu a excreção no sêmen em 78% dos animais. O tratamento com oxitetraciclina convencional em associação com estreptomicina durante sete dias, reduziu a excreção do agente em 89% dos animais (Dargatz *et al.*, 1990).

Em suínos, estudos recentes sugerem que uma monoterapia prolongada com oxitetraciclina administrada oralmente na alimentação (20 mg/kg durante pelo menos 90 dias), embora não seja totalmente eficaz para curar a totalidade dos animais infectados,

reduz consideravelmente a infecção, minimiza o impacto clínico produzido pela infecção por *B. suis* biovar 2, reduzindo a excreção (e novos contágios), a ocorrência de abortos e permite manter a produtividade e rentabilidade da exploração afetada (Blasco *et al*, 2010).

1.6 Agentes Antimicrobianos

A emergência de microrganismos patogénicos resistentes a tratamentos de primeira linha é uma realidade preocupante, associada a níveis elevados de mortalidade e de morbilidade no Homem. Muitas das infecções não são tratáveis, devido à resistência dos microrganismos a todos os agentes antimicrobianos utilizados no tratamento (OMS, 2012). Os mecanismos pelos quais os organismos adquirem resistência são, por vezes, bem conhecidos, como a pressão seletiva resultante da exposição a agentes antimicrobianos (OMS, 2002).

A propagação de bactérias resistentes numa população pode ocorrer através da água, do alimento e do contacto entre indivíduos contaminados e sãos. As evidências sugerem que uma utilização mais cuidadosa dos agentes antimicrobianos nas medicinas humana e veterinária, no manejo animal e na agricultura podem ter um impacto significativo no controlo da emergência das resistências (OMS, 2002). De facto, os antimicrobianos são largamente utilizados na agricultura e na pecuária e no tratamento e prevenção de infeções nos animais de produção e de companhia (OMS, 2012).

As bactérias intracelulares, como as do género *Brucella*, definem-se pela sua capacidade de sobrevivência dentro das células eucariotas hospedeiras, tendo, para tal, desenvolvido várias estratégias para sobreviver no seu interior. Os antimicrobianos utilizados no tratamento de infeções causadas por estes agentes intracelulares devem, assim, ter a capacidade de atingir os compartimentos celulares onde estes se situam, através da circulação sistémica e permanecer ativos no compartimento celular alvo, sem sofrer inativação por parte do metabolismo celular e/ou efeitos deletérios de pH (alguns antimicrobianos são mais ativos num pH neutro ou básico, mas outros, como a rifampicina, são mais ativos em pH ácido) (Biswas *et al.*, 2008).

O tratamento das infeções bacterianas complica-se com a capacidade que as bactérias possuem em desenvolver resistência aos diversos agentes antimicrobianos. Esta resistência pode ser causada por uma grande variedade de mecanismos: (i) a presença de uma enzima que inativa o agente antimicrobiano; (ii) uma mutação do alvo do agente antimicrobiano que reduz a sua capacidade de ligação e (iii) influxo reduzido e/ou o efluxo ativo do agente antimicrobiano (Fluit *et al.*, 2001). A resistência pode desenvolver-se por dois processos genéticos: (i) mutação e seleção (transferência vertical) e (ii) troca de genes

entre estirpes e espécies (transferência horizontal). Nas bactérias intracelulares, a resistência aos antimicrobianos ocorre principalmente por mutação espontânea ou mutações múltiplas no genoma bacteriano (transferência vertical) (Dugan *et al.*, 2004). No entanto, a presença de um gene de resistência não confere necessariamente um insucesso na terapêutica, pois o nível de expressão do gene pode ser variável (Fluit *et al.*, 2001).

1.6.1 Tetraciclinas

As tetraciclinas são classificadas pela OMS como “highly important”, devido ao seu papel principal no tratamento da brucelose. Em muitos países, esta doença foi erradicada dos animais de produção, no entanto, em zonas do mundo onde a população pode contrair a doença através destes animais, este grupo de antimicrobianos deve ser considerado “critically important” (OMS, 2012).

São agentes antimicrobianos de largo-espectro, ativos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias-anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas. São agentes antimicrobianos de primeira ou segunda escolha para muitas infecções. Atuam inibindo primariamente a síntese proteica bacteriana ao nível da subunidade ribossômica 30S, impedindo a ligação codão-anticodão. Atravessam a membrana externa bacteriana por via hidrófila, através dos canais de porina e a membrana citoplasmática por transporte ativo (Sousa, 2006e).

As propriedades antimicrobianas destes agentes e a ausência de grandes efeitos adversos, levou à sua utilização extensiva no tratamento de infeções humanas e animais. Em alguns países foram adicionadas em níveis sub-terapêuticos na alimentação animal como promotores de crescimento, o que poderá ter contribuído para a emergência de resistências em agentes patogénicos humanos (Chopra & Roberts, 2001; Michalova *et al.*, 2004).

Atualmente, a incidência da resistência às tetraciclinas é muito elevada e atinge numerosas espécies bacterianas que podem ser isoladas de humanos, animais, alimentos e ambiente (Fluit *et al.*, 2001; Sousa, 2006e).

A utilização alargada desta classe de antimicrobianos na prática clínica tem sido responsável pela seleção de organismos resistentes. O aumento desta incidência tem resultado num esforço para a compreensão dos mecanismos pelos quais os determinantes genéticos da resistência são transferidos entre bactérias e a base molecular dos próprios

mecanismos (Chopra & Roberts, 2001). Os principais mecanismos de resistência às tetraciclina são devidos: **(i)** à impermeabilização da membrana externa das bactérias Gram-negativas; **(ii)** à alteração do local alvo do fármaco no ribossoma e **(iii)** à fraca incorporação intracelular e elevado efluxo de antimicrobiano (Sousa, 2006e).

1.6.2 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são considerados os principais agentes terapêuticos utilizados em monoterapia ou em associação, no tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos e por cocos Gram-positivos (Sousa, 2006b).

Estes fármacos atuam por ligação a alvos na subunidade ribossômica 30S, causando alterações na síntese proteica. Deste modo, ocorre uma leitura errada do código genético, dando origem a proteínas que se incorporam na membrana citoplasmática bacteriana, o que leva a alterações na sua permeabilidade. Isto resulta na criação de canais que facilitam o influxo do agente antimicrobiano e causam perturbações na composição iônica bacteriana. O aumento da concentração intracelular destes agentes bloqueia todos os ribossomas bacterianos, impedindo a síntese proteica (Sousa, 2006b).

A pressão seletiva, principalmente no meio hospitalar, resultante do uso empírico generalizado dos aminoglicosídeos tem conduzido ao surgimento de numerosas estirpes bacterianas resistentes a estes agentes (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Sousa, 2006b). Estas resistências podem ser mediadas por plasmídeos, transposões e integroes, que se disseminam facilmente entre estirpes bacterianas da mesma espécie ou espécies diferentes, ou podem ser de origem cromossômica. De um modo geral, quando as estirpes bacterianas exibem impermeabilidade à gentamicina, manifestam também resistência em relação a outros aminoglicosídeos (Sousa, 2006b).

Os principais mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos são a: (i) baixa incorporação ou acumulação intracelular (como por exemplo, uma alteração ou quantidade reduzida dos canais de porina); (ii) expressão de enzimas bacterianas que modificam e inativam o antimicrobiano; (iii) alterações no alvo ribossômico (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Sousa, 2006b).

1.6.3 Sulfonamidas e Trimetoprim

As sulfonamidas e o trimetoprim são antimicrobianos de largo-espectro de ação, ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, alargando o seu espectro de ação quando usados em conjunto. Os dois compostos, quando utilizados em simultâneo, inibem dois passos sucessivos da mesma cadeia metabólica que conduz à formação de cofatores folato, tendo, cada um deles, uma acção bacteriostática. A combinação trimetoprim-sulfametoxazol é usada em medicina humana no tratamento de infeções do trato urinário, intestinal e respiratório inferior (Sousa, 2006d). Em medicina veterinária, as sulfonamidas são largamente usadas, por vezes em combinação com outros agentes antimicrobianos, para prevenir e tratar diarreia e outras infeções nos sistemas de produção animal intensiva (Perreten & Boerlin, 2003).

Diversos mecanismos podem justificar as resistências bacterianas a estes agentes. A sua associação tem como vantagem reduzir, sobretudo, o desenvolvimento de resistência bacteriana, em comparação com a monoterapia (Huovinen, 2001; Sousa, 2006d).

A resistência bacteriana a estes compostos é mediada pelos seguintes mecanismos: (i) baixa incorporação celular do fármaco (devido a uma barreira na permeabilidade ou bombas de efluxo); (ii) alterações, mutações ou recombinações nas enzimas alvo; (iii) resistência adquirida pelas enzimas alvo (Huovinen, 2001; Sousa, 2006d).

1.6.4 Rifampicina

A rifampicina é um derivado semisintético da rifampicina B, sendo esta produzida por *Ammycolatopsis mediterranei*. Inibe a transcrição nas células bacterianas susceptíveis, por inibição da polimerase do ácido ribonucleico (RNA, do inglês “Ribonucleic acid”), ligando-se à sua subunidade β , impedindo a síntese de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA, do inglês “Messenger Ribonucleic acid”). Possui um efeito bactericida (Sousa, 2006c).

É um agente de 1ª linha no grupo dos antimicrobianos antituberculosos. É utilizada em associação com outros fármacos no tratamento da infecção tuberculosa pulmonar e extra-pulmonar e endocardites e, embora não possua grande actividade contra bactérias Gram-negativas, a rifampicina é activa na infecção por *Brucella* spp. (Sousa, 2006c).

A resistência à rifampicina, na maioria das bactérias, incluindo em *Brucella* spp., está associada a mutações no gene *rpoB*, o gene que codifica o alvo deste agente antimicrobiano: a subunidade β da RNA polimerase (Cavusoglu *et al.*, 2002; Marianelli *et al.*, 2004; Sousa, 2006c; Sandalakis *et al.*, 2012). As RNA polimerases com alterações na subunidade β ficam impedidas de se ligarem ao antimicrobiano (Sandalakis *et al.*, 2012).

1.6.5 Polimixinas

A polimixina B e a colistina não penetram nas células eucarióticas e não são usadas no tratamento da Brucelose, no entanto, são normalmente incluídas em meios selectivos para isolamento de *Brucella* spp. de amostras veterinárias (Alton *et al.*, 1988).

São compostos catiónicos com atividade na superfície bacteriana, em pH fisiológico. Ligam-se electrostaticamente às membranas externas, interferindo com a estrutura dos fosfolípidos e componentes do LPS bacteriano. Destroem as bactérias de um modo semelhante ao dos péptidos catiónicos naturais do sistema imune do hospedeiro (Jensen & Halling, 2010). Interagem com o lípido A do LPS bacteriano e com os fosfolípidos da membrana citoplasmática, permitindo a penetração do fármaco e dando origem à perda de aminoácidos e nucleótidos, causando a morte celular (Sousa, 2006a).

As polimixinas são ativas contra bactérias Gram negativo e não possuem atividade contra bactérias Gram positivo. Como atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática, facilitam o acesso de outros fármacos ao seu alvo, pelo que são usadas, geralmente, em associação com outros fármacos, em preparações tópicas para uso oftálmico e dermatológico. Sob a forma de sulfato, usam-se por via parenteral ou tópica (Sousa, 2006a).

A impermeabilização da membrana externa e a alteração fosfolipídica da membrana citoplasmática estão na base da resistência das bactérias Gram-negativas às polimixinas. As bactérias Gram-positivas possuem uma resistência natural a este fármaco, devido à espessura da sua parede celular, que impede a sua penetração (Sousa, 2006a).

O género *Brucella* é resistente à polimixina-B; no entanto, existem diferenças na susceptibilidade das várias espécies. Estas bactérias são relativamente resistentes aos agentes antimicrobianos catiónicos devido à sua superfície hidrofóbica e estrutura de LPS. *B. suis* e *B. melitensis* são as menos susceptíveis à acção das polimixinas, ao contrário das estirpes rugosas, que apresentam maior susceptibilidade do que as estirpes lisas. Algumas

estirpes são menos susceptíveis à polimixina-B quando incubadas em CO₂ em vez de atmosfera normal; outras tornam-se mais susceptíveis em meio acidificado (Jensen & Halling, 2010).

1.7 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos

A determinação da susceptibilidade a antimicrobianos de um isolado clínico é crucial para o sucesso da terapia antimicrobiana. Esta necessidade é ainda maior devido ao crescente aparecimento de resistências e emergência de organismos multiresistentes (Fluit *et al.*, 2001). Os testes de susceptibilidade estão indicados para serem efectuados em qualquer organismo que provoque um processo infeccioso que justifique a utilização de terapêutica antimicrobiana, sempre que a sua susceptibilidade seja desconhecida ou no caso deste pertencer a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos geralmente usados no tratamento (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006).

Existem diversos métodos laboratoriais que podem ser usados para testar a susceptibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos (CLSI, 2006), como a diluição em agar, diluição em caldo (macro e microdiluição), a difusão por disco e o E-test. Os métodos de difusão por disco, diluição em caldo e diluição em agar têm demonstrado de forma consistente, resultados reprodutíveis (OIE, 2012c).

1.7.1 Concentração Mínima Inibitória

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microorganismo em testes de susceptibilidade *in vitro* (CLSI, 2006).

Para tal, é utilizada uma série de diluições de progressão geométrica de razão 2 (1, 2, 4, 8, 16 mg/l, etc), podendo, no entanto, ser usadas outras concentrações, quando são conhecidos os “breakpoints” para o agente bacteriano (ex. 4, 6, 8, 12 mg/l). Quando existe inibição do crescimento na menor concentração testada, o verdadeiro valor da CMI não pode ser determinado com exatidão. É considerado como igual ou menor que o valor mais baixo da concentração utilizada (CLSI, 2006).

Os resultados da determinação da CMI devem ser acompanhados de uma categoria de interpretação: susceptível, intermédia, ou resistente (CLSI, 2006).

1.7.2 Categorias de Interpretação

Existem várias categorias de interpretação dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos. Esta classificação é baseada na resposta *in vitro* de um organismo a níveis de um agente antimicrobiano que correspondem aos níveis sanguíneos ou tecidulares que se atingem com as doses do agente normalmente prescritas (CLSI, 2006).

Um organismo é considerado “susceptível” quando há inibição do crescimento pela concentração do agente antimicrobiano testado e que é atingida quando é prescrita a dose recomendada para o local de infecção (CLSI, 2006).

A categoria “intermédia” inclui os isolados que apresentam CMI de agentes antimicrobianos que, normalmente, atingem concentrações sanguíneas e tecidulares aceitáveis e para os quais a taxa de resposta pode ser mais baixa que nos isolados susceptíveis. Isto significa que existe eficácia clínica nos locais onde os agentes estão fisiologicamente concentrados (ex. quinolonas e β -lactâmicos na urina) ou quando é usada uma dose mais elevada que a normalmente prescrita (ex. β -lactâmicos) (CLSI, 2006).

Na categoria “resistente” incluem-se os isolados que não são inibidos pela concentração sistémica do agente normalmente atingida com a terapêutica normal e/ou apresentam CMIs que estão no intervalo onde é mais comum a ocorrência de mecanismos específicos de resistência microbiana (ex. β -lactamases) e cuja eficácia clínica do agente contra o isolado não foi demonstrada (CLSI, 2006).

1.7.3 Métodos de Diluição

Os métodos de diluição são utilizados para a determinação da CMI. Nestes testes, é avaliada a capacidade de crescimento visível dos microorganismos em placa com meio de cultura (diluição em agar) ou em em caldo: em tubos de ensaio (macrodiluição) ou em microplaca (microdiluição) (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2000; CLSI, 2006). O resultado final destes testes é influenciado pela metodologia, a qual deve ser cuidadosamente controlada para se obterem resultados reproduzíveis, inter e intra laboratorialmente (CLSI, 2006).

1.7.3.1 Diluição em agar

Neste método, as concentrações seriadas de vários agente antimicrobianos são incorporadas em meio Mueller-Hinton Agar, em placa de Petri. Cada placa contém uma diferente concentração do agente antimicrobiano. Os inóculos bacterianos são aplicados na superfície do agar. Após um período de incubação, variável consoante o agente bacteriano, observa-se o crescimento visível, e é lido o valor da CMI a partir da observação visual das placas (figura 2) (CLSI, 2006; EUCAST, 2000).

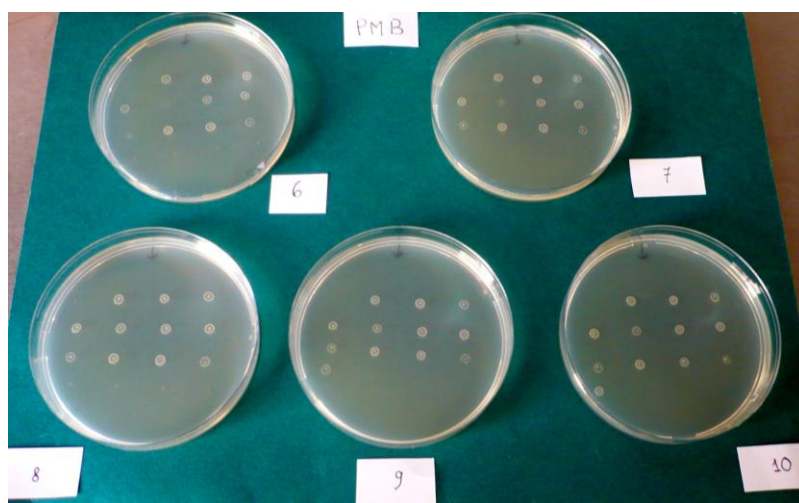


Figura 2: Teste de susceptibilidade de estirpes de *B. suis* à Polimixina-B pela técnica de diluição em agar Mueller-Hinton.
Cada placa numerada (6,7,8,9,10) possui uma concentração diferente do agente antimicrobiano (Original do autor, 2012).

1.7.3.2 Diluição em caldo (Macrodiluição e Microdiluição)

Nesta técnica, uma suspensão bacteriana de uma concentração determinada é testada contra variadas concentrações de um agente antimicrobiano (normalmente em progressão geométrica de razão 2) em meio de cultura líquido. Pode ser realizada em tubos com um volume mínimo de 2 ml (macrodiluição) ou em microplaca (microdiluição) (OIE, 2012c). Na microdiluição, o agente antimicrobiano é dispensado nos vários poços da microplaca, contendo o meio de cultura líquido. O inóculo da suspensão bacteriana é acrescentado posteriormente no poço. Após incubação, são lidos os resultados e é determinada a CMI. Na macrodiluição, o agente microbiano é dispensado em tubos, contendo meio de cultura líquido. Em seguida, os tubos são inoculados com a suspensão

bacteriana do microorganismo a ser testado. Após incubação, são registrados os resultados e é determinada a CMI (CLSI, 2006).

1.7.4 E-test®

O E-test® é um teste comercial. Consiste na aplicação de uma tira que contém um gradiente contínuo do agente antimicrobiano que corresponde a 15 diluições de progressão geométrica de razão 2 em meio de cultura sólido (Kelly *et al.* 1999; Biomerieux, 2012). O E-test, embora dispendioso, pode ser utilizado no teste da susceptibilidade de *Brucella* spp, sendo menos laborioso, menos fastidioso e mais prático que o método de microdiluição (Clark *et al.* 1998; Gür *et al.*, 1999; Bayram *et al.*, 2011). A tira é aplicada na superfície previamente inoculada do meio de cultura. Após incubação, irá formar-se uma elipse, que demarca o valor da CMI na escala ($\mu\text{g/ml}$) onde a concentração de antimicrobiano testado inibe o crescimento bacteriano (Biomerieux, 2012).



Figura 4: E-test® (Adaptado de Biomerieux, 2012).

1.7.5 Métodos moleculares

A utilização de uma abordagem molecular para a detecção de genes de resistência antimicrobiana tem sido promovida como uma forma de aumentar a rapidez e especificidade dos testes de susceptibilidade e tem tido um papel importante na explicação dos

mecanismos de resistência (Fluit *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2003). Estão a ser desenvolvidos inúmeros ensaios genéticos, para detetar a resistência bacteriana aos antimicrobianos. Entre eles, destacam-se a amplificação e sequenciação de genes e a comparação entre genomas. Estes métodos, em conjunto com a análise fenotípica, aumentam a sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção de genes de resistência específicos (Cai *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Perreten *et al.* 2005; OIE, 2012c).

Os testes genotípicos têm sido usados com sucesso, como suplemento dos testes tradicionais da susceptibilidade aos antimicrobianos com base no fenótipo. É o caso de organismos do género *Staphylococcus* resistentes à meticilina, enterococos resistentes à vancomicina e a detecção de mutações que conferem resistência a fluoroquinolonas (Cai *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Perreten *et al.* 2005). Foram, também, descritos outros métodos moleculares para a detecção de genes codificantes de beta-lactamases, de enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos e de genes de efluxo de tetraciclinas (Chen *et al.*, 2005; Perreten *et al.* 2005).

Os novos avanços na tecnologia podem facilitar a capacidade de testar uma grande quantidade de espécies bacterianas para um grande número de genes que conferem resistência aos antimicrobianos de forma rápida e económica, fornecendo dados relevantes para programas de vigilância e monitorização. No entanto, apesar do influxo de testes moleculares, no futuro próximo, os testes de susceptibilidade a antimicrobianos (CMI) ainda são necessários, para detetar a emergência de novos mecanismos de resistência entre agentes patogénicos (Fluit *et al.*, 2001; OIE, 2012c).

No período de 17 de Outubro de 2011 a 17 de Abril de 2012, foram acompanhadas e realizadas todas as atividades necessárias para o desenvolvimento de um trabalho laboratorial, tendo como objetivo:

Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes de *Brucella suis* e sua comparação com estirpes de *B. melitensis* e de *B. abortus* através da determinação da Concentração Mínima Inibitória, pela técnica de diluição em agar Mueller-Hinton, descrita na norma M7-A7 (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically) do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

As atividades desenvolvidas incluíram vários ensaios, tendo-se determinado a Concentração Mínima Inibitória (CMI), de um total de 89 estirpes bacterianas: 75 estirpes de *B. suis* (70 de campo e 5 de referência), 11 estirpes de *B. melitensis* (8 de campo e 3 de referência) e 3 estirpes de referência de *B. abortus* para os agentes antimicrobianos em estudo (tetraciclina, doxiciclina, estreptomicina, gentamicina, rifampicina, trimetoprim, sulfametoxazol e polimixina-B).

O trabalho foi desenvolvido no âmbito do Estágio Curricular de conclusão do Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias de Lisboa, tendo decorrido na Unidade Estratégica de Produção e Saúde Animal do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.), sob a supervisão da Investigadora Principal, Doutora Maria Inácia Aleixo Vacas de Carvalho Corrêa de Sá.

2. Material e Métodos

2.1 Estirpes bacterianas

Para a realização do trabalho experimental foram seleccionadas 89 estirpes de *Brucella* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Brucelose da Unidade Estratégica de Produção e Saúde Animal do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.): 9 estirpes de campo de *B. suis* biovar 1; 59 estirpes de campo de *B. suis* biovar 2; 2 estirpes de campo de *B. suis* biovar 4; 8 estirpes clínicas de *B. melitensis* isoladas de humanos; 5 estirpes de referência de *B. suis* (1-5); 3 estirpes de referência de *B. melitensis* (1-3) e 3 estirpes de referência de *B. abortus* (1-3). As estirpes em estudo estavam conservadas a -80 °C, em leite desnatado. Antes da sua utilização, foram incubadas em atmosfera normal, à temperatura de 37°C, durante 48 horas, em placas de meio agar tripticase de soja (DIFCO). Para controlo de qualidade dos ensaios foi incluída no estudo a estirpe de referência *E. coli* ATCC 25922, como recomendado pela norma M100-S17 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing) do CLSI.

Todas as estirpes de *Brucella* em estudo estão sumarizadas na tabela 2 com informação referente à origem/referência e hospedeiro.

Tabela 2: Estirpes de *Brucella* em estudo no ensaio da determinação da susceptibilidade a antimicrobianos.

Biovar	nº de estirpes	Origem	Hospedeiro	
Estirpes de campo de <i>Brucella suis</i>				
1	9	5	França	Suíno (3), Lebre (1), Homem (1)
		1	Croácia	Suíno
		1	E.U.A.	Suíno
		1	Holanda	Homem
		1	México	Homem
2	59	26	Portugal	Suíno (12), Javali (11), Ovino (2), Bovino (1)
		15	Espanha	Suíno (10), Javali (5)
		9	França	Lebre (4), Suíno (4), Ovino (1)
		4	Alemanha	Javali
		1	Croácia	Suíno
		1	Dinamarca	Desconhecido
		1	Itália	Javali
4	2	1	Alasca	Caribou
		1	Polónia	Rena
Estirpes de campo de <i>Brucella melitensis</i>				
1	1	Hospitais Portugueses	Homem	
3	7			
Estirpe	Biovar	Referência	Hospedeiro	
Estirpes de referência de <i>Brucella</i>				
<i>B. suis</i> 1330	1	ATCC 23444	Suíno	
<i>B. suis</i> Thomsen	2	ATCC 23445	Suíno	
<i>B. suis</i> 686	3	ATCC 23446	Suíno	
<i>B. suis</i> 40	4	ATCC 23447	Rena	
<i>B. suis</i> 513	5	NCTC 11996	Roedor selvagem	
<i>B. melitensis</i> 16 M	1	ATCC 23456	Caprino	
<i>B. melitensis</i> 63/9	2	ATCC 23457	Caprino	
<i>B. melitensis</i> Ether	3	ATCC 23458	Caprino	
<i>B. abortus</i> 2308	1	Dr. J.M. Blasco; CITA	Bovino	
<i>B. abortus</i> 86/8/59	2	ATCC 23449	Bovino	
<i>B. abortus</i> Tulya	3	ATCC 23450	Humano	

ATCC, American Type Culture Collection; CITA, Centro de Investigación y Tecnología Agro Alimentaria del Gobierno de Aragón; NCTC, The National Collection of Type Cultures.

2.2 Determinação da Susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada a partir do valor da Concentração Mínima Inibitória (CMI), que é a concentração mínima de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano, expressa em mg/L (OIE, 2012c), através da técnica de diluição em agar Mueller-Hinton, como descrita na norma M7-A7 (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically) do CLSI.

2.2.1 Técnica de diluição em agar Mueller-Hinton

Nesta técnica, o agente antimicrobiano é incorporado no agar Mueller-Hinton (DIFCO), contendo cada placa uma concentração diferente do agente, de modo a obter uma série de diluições finais em progressão geométrica de razão 2.

Os seguintes antimicrobianos foram utilizados: doxiciclina (Fluka, 44577), estreptomicina (Sigma, S9137), gentamicina (Sigma, G3632), polimixina-B (Sigma, P1004), rifampicina (Sigma, R3501), sulfametoxazol (Fluka, S7507), tetraciclina (Sigma, T3258) e trimetoprim (Sigma, T7883). O intervalo das concentrações finais dos antimicrobianos nas placas de agar Mueller-Hinton foram de 1 µg/ml a 512 µg/ml.

A técnica compreendeu quatro passos:

- i. Preparação das placas de agar Mueller-Hinton com incorporação do antimicrobiano

Após a preparação do meio de cultura e sua estabilização a $\pm 48-50^{\circ}\text{C}$, procedeu-se à incorporação de 1ml de cada diluição de antimicrobiano em 19ml de meio de cultura, distribuídos em cada placa, seguida de homogeneização e secagem em câmara de fluxo-laminar, durante 30 minutos.

- ii. Preparação do inóculo bacteriano

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de uma suspensão bacteriana com cerca de 10^8 ufc/mL (0.5 na escala de McFarland) das estirpes em estudo, procedendo-se à sua diluição 1:10 em soluto fisiológico estéril.

iii. Inoculação das placas

A inoculação das placas foi realizada à temperatura ambiente, em câmara de fluxo laminar e utilizando micropipeta multicanal calibrada (8 canais – 0-2.5µl). Foi dispensado um inóculo contendo 2 µl de suspensão bacteriana, com aproximadamente 10^4 ufc/mL, na superfície do meio de cultura.

Para controlo da viabilidade das estirpes em estudo durante o processo da inoculação, foram inoculadas três placas, em meio sem antimicrobiano, no início, meio e final do ensaio.

Após secagem do inóculo à temperatura ambiente, procedeu-se à incubação das placas a 37°C, durante 48 horas, em atmosfera normal.

iv. Leitura dos resultados

A leitura das placas foi realizada por observação visual, considerando-se a CMI como a concentração mais baixa de antimicrobiano em que não se verificou crescimento bacteriano visível, com a excepção dos antimicrobianos bacteriostáticos (sulfametoxazol e trimetoprim), em que a CMI foi considerada como a concentração mais baixa do agente capaz de inibir em cerca de 80% de crescimento bacteriano visível.

Para as estirpes de *Brucella*, esta leitura foi realizada às 48 horas, enquanto que a leitura da estirpe de referência *E. coli* ATCC 25922 foi realizada às 24 horas.

Os critérios de susceptibilidade utilizados para a interpretação dos valores da CMI obtida para as estirpes de *Brucella* spp em estudo, no caso das tetraciclina e aminoglicosídeos, foram os constantes na norma M100-S17 (“Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing”) do CLSI (2007), apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Critérios de interpretação da CMI de *Brucella* spp, para as tetraciclinas e para os aminoglicosídeos. (Adaptado da norma M100-S17 do CLSI, 2007)

Agente Antimicrobiano		Critérios de Interpretação da CMI (µg/mL)		
		S	I	R
Aminoglicosídeos	Gentamicina	≤ 4	-	-
	Estreptomicina	≤ 8	-	-
Tetraciclinas	Tetraciclina	≤ 1.0	-	-
	Doxiciclina	≤ 1.0	-	-

S – Susceptível; I – Intermédio; R – Resistente.

A validação dos ensaios foi efectuada de acordo com os seguintes parâmetros:

- i) os valores referência da CMI para os vários antimicrobianos da estirpe *E.coli* ATCC 25922 estarem dentro dos parâmetros estabelecidos pela norma M100-S17 do CLSI;
- ii) uma boa viabilidade das estirpes ao longo do ensaio.

3. Resultados

Com base no número de ocorrências (número de estirpes em estudo) que apresentaram uma determinada CMI, expressa em mg/L, foram calculadas, em alguns casos, a CMI₅₀ e a CMI₉₀, ou seja, a concentração mínima inibitória capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% das estirpes, respetivamente. Os valores da CMI, CMI₅₀ e CMI₉₀, expressos em mg/L, estão apresentados nas tabelas 4 a 7.

De um modo geral, a maioria das estirpes em estudo, de *B. suis*, *B. melitensis* e *B. abortus* demonstram ser igualmente susceptíveis às tetraciclina (tetraciclina e doxiciclina), aos aminoglicosídeos (estreptomicina e gentamicina) e à rifampicina, apresentando uma CMI ≤ 1 mg/L (tabelas 4-7). No entanto, uma estirpe de *B. suis* biovar 2 apresenta um fenótipo diferente, com diferenças significativas na susceptibilidade a vários agentes antimicrobianos, entre os quais a estreptomicina (8 mg/L), a gentamicina (64 mg/L) e a rifampicina (4 mg/L) (tabela 7).

De acordo com os critérios de interpretação da norma M100-S17 (2007) do CLSI, todas as estirpes de *B. suis*, *B. melitensis* e *B. abortus* incluídas neste estudo são susceptíveis à tetraciclina e à doxiciclina, por apresentarem uma CMI de valor ≤ 1 mg/L; também para a estreptomicina e gentamicina, a totalidade das estirpes de *B. suis*, *B. melitensis* e *B. abortus* incluídas neste estudo são suscetíveis. Embora a estirpe de fenótipo diferente de *B. suis* biovar 2 apresente uma CMI de 8 mg/L para a estreptomicina, valor bastante superior ao das restantes estirpes em estudo, é ainda considerada suscetível a este antimicrobiano (tabela 7). No que respeita à gentamicina, a mesma estirpe apresenta uma CMI de 64 mg/L (tabela 7), muito acima do limite de susceptibilidade (4 mg/L).

Para o trimetoprim, as concentrações inibitórias mínimas das estirpes de campo de *Brucella suis* em estudo variam entre 8 e 32 mg/L (tabela 4), as de *B. melitensis* entre 8 e 16 mg/L (tabela 5) e *B. abortus* entre 2 e 8 mg/L (tabela 6). As estirpes de *B. suis* são as que mostram a maior CMI para este agente e as estirpes de *B. abortus* a menor. Relativamente aos biovars de *B. suis*, o biovar 2 revela uma CMI₉₀ mais elevada (32 mg/L), do que as estirpes do biovar 1 (CMI₉₀ = 16 mg/L) e do biovar 4 (CMI₉₀ = 2-8 mg/L) (tabela 4). No caso das estirpes de referência de *B. suis*, os biovars 1, 3 e 5 demonstram uma CMI elevada (32 mg/L), enquanto que os biovars 2 e 4 são os que apresentam a menor CMI, de 16 e 8 mg/L, respetivamente (Tabela 4).

Quanto ao sulfametoxazol, as estirpes de *B. suis* são as que apresentam a maior CMI (≤ 1 a 8 mg/L) (tabela 4), sendo as de *B. melitensis* e de *B. abortus* as que apresentam o menor valor (≤ 1 mg/L) (tabelas 5 e 6). Os biovars 1 e 2 das estirpes de campo de *B. suis* apresentam uma CMI₉₀ mais elevada (4 mg/L) do que o biovar 4 (≤ 1 mg/L). No caso das estirpes de referência de *B. suis*, os biovars 5 e 2 apresentam uma CMI mais alta (8 e 4 mg/L, respectivamente) do que os biovars 1, 3 e 4 (tabela 4). A estirpe de comportamento atípico de *B. suis* biovar 2 apresenta uma CMI de 512 mg/L (tabela 7).

Relativamente à polimixina-B, também as estirpes de *B. suis* são as que revelam a CMI mais alta (16 a 128 mg/L) (tabela 4). A CMI das estirpes de *B. melitensis* é de 64 mg/L, sendo a CMI de *B. abortus* a mais baixa (≤ 1 a 16 mg/L) (tabelas 5 e 6). Neste caso, as estirpes de campo e referência de *B. suis* biovar 2 e as de referência de *B. abortus* são as que apresentam menor valor de CMI (16 mg/L) (Tabela 4 e 6). No entanto, a estirpe de *B. suis* biovar 2, de fenótipo diferente, revela uma CMI mais elevada (128 mg/L) (tabela 7), comparável às estirpes de campo de *B. suis* biovar 4. Estas apresentam o valor mais elevado de CMI (64 a 128 mg/L), seguidas pelas estirpes de campo de *B. suis* biovar 1 e de *B. melitensis* (64 mg/L) (tabelas 4 e 5). Também a estirpe de referência de *B. suis* biovar 4 é a que apresenta o maior valor de CMI (128 mg/L), seguida pelas estirpes de referência de *B. melitensis* dos biovars 1 e 3 (64 mg/L).

Tabela 4: Valores de CMI₅₀ e CMI₉₀ para as estirpes de campo de *B. suis* biovar 1, biovar 2 e biovar 4 e CMI das estirpes de referência de *B. suis* (biovars 1 a 5).

Agente antimicrobiano	Estirpes de campo				Estirpes de Referência							Intervalo de Concentração (mg/L)
	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₉₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₉₀ (mg/L)	CMI (mg/L)		CMI (mg/L)					
	Bv 1 (n=9)		Bv 2 (n=59)		Bv 4 estirpe 1	Bv 4 estirpe 2	Bv 1	Bv 2	Bv 3	Bv 4	Bv 5	
Tetraciclina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	1 - 512
Doxiciclina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	
Estreptomicina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	
Gentamicina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	
Trimetoprim	16	16	16	32	8	2	32	16	32	8	32	
Sulfametoxazol	≤1	4	≤1	4	≤1	≤1	≤1	4	2	≤1	8	
Rifampicina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	
Polimixina-B	32	64	16	16	128	64	64	16	32	128	32	

Bv - biovar

3). **Tabela 5:** Valores da CMI para as estirpes de campo de *B. melitensis* biovar 1, biovar 3 e das estirpes de referência de *B. melitensis* (biovars 1 a

Agente antimicrobiano	CMI (mg/L)					Intervalo de Concentração (mg/L)
	Estirpes de campo		Estirpes de referência			
	Bv 1	Bv 3 (n=7)	Bv 1	Bv 2	Bv 3	
Tetraciclina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	1 - 512
Doxiciclina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	
Estreptomicina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	
Gentamicina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	
Trimetoprim	8	16	16	64	8	
Sulfametoxazol	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	
Rifampicina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	
Polimixina-B	64	64	64	≤1	64	

Bv - biovar

Tabela 6: Valor da CMI das estirpes de referência de *B. abortus* (biovars 1 a 3).

Agente antimicrobiano	CMI (mg/L)			Intervalo de Concentração (mg/L)
	Bv 1	Bv 2	Bv 3	
Tetraciclina	≤1	≤1	≤1	1 - 512
Doxiciclina	≤1	≤1	≤1	
Estreptomicina	≤1	≤1	≤1	
Gentamicina	≤1	≤1	≤1	
Trimetoprim	8	2	8	
Sulfametoxazol	≤1	≤1	≤1	
Rifampicina	≤1	≤1	≤1	
Polimixina-B	16	≤1	8	

Bv - biovar

Tabela 7: Número de ocorrências para determinada CMI das estirpes de campo de *B. suis* biovar 2.

Agente antimicrobiano	Nº de ocorrências para a CMI (mg/L)										Total (n)
	≤1	2	4	8	16	32	64	128	216	512	
Tetraciclina	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	59
Doxiciclina	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Estreptomicina	58	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	
Gentamicina	58	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	
Trimetoprim	0	0	0	14	27	18	0	0	0	0	
Sulfametoxazol	45	0	11	2	0	0	0	0	0	1*	
Rifampicina	58	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	
Polimixina-B	0	0	1	24	29	3	1	1*	0	0	

* - estirpe de comportamento atípico.

4. Discussão

Os microorganismos do género *Brucella* possuem a capacidade de sobreviver dentro dos macrófagos, evitando a acção bactericida de alguns agentes antimicrobianos. A combinação de agentes antimicrobianos que atuam em sinergia e com atividade intracelular revela melhores resultados; no entanto, as razões pelas quais alguns pacientes apresentam recidivas são ainda desconhecidas (Cekovska *et al.*, 2010). Estas são causadas, frequentemente, por falhas na terapêutica e, raramente, por estirpes de *Brucella* resistentes aos antimicrobianos. É, ainda, desconhecida a contribuição do desenvolvimento da resistência, durante o tratamento, para o sucesso clínico (Ayaslioglu *et al.*, 2008; Cekovska *et al.*, 2010).

O presente trabalho teve como objectivo o estudo da susceptibilidade *in vitro* de estirpes de campo de *Brucella suis* aos antimicrobianos, alguns dos quais utilizados frequentemente no tratamento da brucelose humana, e a comparação com a susceptibilidade de estirpes de *B. melitensis* isoladas de humanos e estirpes de referência de *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis*, aos mesmos agentes.

O estudo da susceptibilidade *in vitro* de *Brucella* spp. aos antimicrobianos não é, regra geral, recomendado, pois a sua realização implica um grande risco de contágio laboratorial e condições de biosegurança de nível III (Ayaslioglu *et al.*, 2008 ; Maves *et al.*, 2011); consequentemente, existem poucos estudos (Cekovska *et al.*, 2010) e a maioria dos testes não estão padronizados (Ariza *et al.*, 1986; Baykam *et al.*, 2004; Bayram *et al.*, 2011).

Os métodos mais utilizados incluem a diluição em agar, a diluição em caldo e o E-test (Cekovska *et al.*, 2010; Bayram *et al.*, 2011). Este último, é menos laborioso que as técnicas de diluição em agar e de microdiluição, e é considerado um método bastante específico e reprodutível, sendo utilizado na maioria dos estudos existentes (Clark *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 1999; Bayram *et al.*, 2011).

Neste trabalho foi utilizado o método de diluição em agar Mueller-Hinton, que, apesar de laborioso, é recomendado pelo CLSI para a maioria dos microrganismos de crescimento aeróbio, pela sua especificidade, sensibilidade e clara leitura dos resultados através da observação visual do crescimento bacteriano na presença do antimicrobiano.

Os Padrões de Interpretação da CMI ($\mu\text{g/mL}$) para potenciais agentes de bioterrorismo, constantes na norma M100-S17 ("Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing") do CLSI (2007), determinam o critério de susceptibilidade de *Brucella*

spp. em relação aos aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina), às tetraciclina (tetraciclina e doxiciclina) e ao trimetoprim-sulfametoxazol, ou seja, determinam o valor da CMI em que os microrganismos são considerados susceptíveis a estes agentes.

A tetraciclina e os seus derivados são os agentes mais eficientes no tratamento da brucelose (Ayaslioglu *et al.*, 2008; Bayram *et al.*, 2011). Embora sejam amplamente utilizados na erradicação de infecções por *Brucella* spp., não existe associação a resistências a este agente (Ayaslioglu *et al.*, 2008). A doxiciclina é a tetraciclina mais prescrita no tratamento da infecção, devido às suas propriedades farmacocinéticas (Ayaslioglu *et al.*, 2008; Bayram *et al.*, 2011). No presente estudo, todas as espécies demonstraram para a tetraciclina e para a doxiciclina o menor valor de CMI: ≤ 1 mg/L. Estes valores são idênticos aos obtidos por outros autores, no teste da susceptibilidade à doxiciclina e à tetraciclina, em estirpes de *B. suis* (Farrel *et al.*, 1976; Tiller *et al.*, 2010a), de *B. melitensis* (Turkmani *et al.*, 2006; Ayaslioglu *et al.*, 2008; Bayram *et al.* 2011; Maves *et al.*, 2011) e de *B. abortus* (Baykam *et al.*, 2004; Tiller *et al.*, 2010a).

Embora a estreptomicina seja também outro dos agentes mais utilizados no tratamento da brucelose, os seus efeitos adversos, como a ototoxicidade, nefrotoxicidade e a necessidade de administração parenteral restringem a sua utilização (Sousa, 2006b; Ayaslioglu *et al.*, 2008; Bayram *et al.*, 2011). A maioria das estirpes em estudo, de *B. suis*, *B. melitensis* e *B. abortus* demonstraram ser igualmente susceptíveis à estreptomicina e gentamicina (CMI ≤ 1 mg/L), resultados semelhantes aos obtidos por outros autores, em *B. suis* (Tiller *et al.*, 2010a), *B. melitensis* (Ayaslioglu *et al.*, 2008; Bayram *et al.*, 2011; Maves *et al.*, 2011) e *B. abortus* (Tiller *et al.*, 2010a).

Como referido anteriormente, embora a estirpe de fenótipo diferente de *B. suis* biovar 2 seja suscetível à estreptomicina (com um valor de CMI bastante superior ao das restantes estirpes), apresenta uma CMI para a gentamicina, muito acima do limite de susceptibilidade (tabela 7).

Uma vez que a resistência aos aminoglicosídeos é frequentemente causada por alterações no local de ligação destes antimicrobianos, através de mutações no alvo ribossómico, é possível que estas alterações impeçam não só a ligação da estreptomicina, mas, também, da gentamicina, neste caso em maior escala, impedindo a sua atividade antimicrobiana.

De um modo geral, as estirpes bacterianas que exibem resistência à gentamicina, manifestam, também, resistência aos restantes aminoglicosídeos (Sousa, 2006b). Uma possível explicação para a menor susceptibilidade desta estirpe bacteriana aos

aminoglicosídeos em estudo seria a presença dessas mutações no alvo ribossômico, impedindo a ligação de ambos os agentes. Outro mecanismo conhecido que confere resistência à gentamicina é a alteração, a redução ou ausência da porina OmpF, uma vez que os aminoglicosídeos se difundem através dos canais de porina. Assim, a alteração ou ausência desta proteína, a par ou não das mutações ribossômicas, poderá explicar o comportamento desta estirpe perante a atividade da gentamicina e da estreptomicina.

O tratamento por trimetoprim-sulfametoxazol é considerado um possível regime terapêutico oral para o tratamento desta infecção, de baixo custo, sendo o mais utilizado em mulheres gestantes e crianças (Bayram *et al.*, 2011). No presente estudo, foram utilizados trimetoprim e sulfametoxazol, a fim de detetar diferenças entre ambos, na susceptibilidade *in vitro*, já que os dois compostos em simultâneo inibem passos sucessivos da mesma cadeia metabólica que conduz à formação do ácido fólico, indispensável para a síntese de ácidos nucleicos e proteínas na célula bacteriana. Em termos gerais, as estirpes de *B. suis*, *B. melitensis* e *B. abortus* apresentam uma CMI mais baixa para o sulfametoxazol (≤ 1 – 8 mg/L) e mais elevada, no caso trimetoprim (2 - 64 mg/L) (tabelas 4 a 6). As estirpes de *B. suis* são as que apresentam maior CMI para o sulfametoxazol (≤ 1 a 4 mg/L) (tabela 4), em relação às estirpes de *B. melitensis* e *B. abortus* (≤ 1 mg/L) (tabelas 5 e 6). No caso do trimetoprim, as estirpes de *B. suis* são as que apresentam, também, a CMI mais elevada (8 - 32 mg/L), em relação às estirpes de *B. melitensis* e *B. abortus* (2 – 16 mg/L). Os estudos existentes da susceptibilidade *in vitro* de *Brucella* spp. testam apenas a combinação trimetoprim-sulfametoxazol, pelo que é difícil comparar os resultados obtidos. A maioria dos autores obteve valores de CMI ≤ 1 mg/L (Marianelli *et al.*, 2007; Ozhak-Baysan *et al.*, 2009; Bayram *et al.*, 2011; Maves *et al.*, 2011), considerando-se essas estirpes suscetíveis ao agente, segundo os critérios de interpretação da norma M100-S17 do CLSI.

Outro agente bastante utilizado no tratamento da brucelose é a rifampicina que, embora apresente alguma toxicidade, possui a vantagem da possibilidade de administração por via oral e exibe um aumento da sua atividade em ambientes acídicos (Ayaslioglu *et al.*, 2008; Bayram *et al.*, 2011). Alguns estudos sugerem a emergência de resistência de *Brucella* spp. a este agente, um conceito preocupante para a saúde pública, pois este agente é utilizado no tratamento da infecção por *M. tuberculosis*, e estas duas infeções existem em simultâneo em algumas regiões. Outros estudos sugerem, também, que a resistência à rifampicina pode levar à resistência a outros agentes antimicrobianos (Bayram *et al.*, 2011). No presente estudo, a maioria das estirpes demonstrou ser igualmente

susceptível à rifampicina (CMI ≤ 1 mg/L) (tabelas 4 a 6), com exceção da estirpe de campo de *B. suis* biovar 2, referida anteriormente (CMI = 4 mg/L) (tabela 7). Este valor, obtido para a maioria das estirpes, é idêntico ao obtido por outros autores, no estudo da susceptibilidade à rifampicina de *B. melitensis* (Turkmani *et al.*, 2006; Ayaslioglu *et al.*, 2008; Maves *et al.*, 2011) e de *B. abortus* (Baykam *et al.*, 2004).

Não existem critérios de interpretação definidos para a rifampicina na norma M100-S17 (2007) do CLSI; no entanto, dado que os resultados obtidos foram idênticos para todas as estirpes de *Brucella*, não só neste estudo, como no de outros autores, poder-se-á considerar que a totalidade das estirpes estudadas é suscetível a este antimicrobiano, com exceção possível da estirpe de *B. suis* biovar 2, que apresenta um fenótipo diferente. Esta apresenta uma CMI de 4 mg/L, no entanto, as doses de rifampicina utilizadas na terapêutica são bastante superiores a este valor (600-900 mg/dia, via oral, durante 6 semanas), sendo sempre utilizado em combinação com outro antimicrobiano, como a doxiciclina e/ou a estreptomicina.

Como já referido, a poliximina-B não penetra nas células eucarióticas, não sendo utilizada no tratamento da brucelose. É incorporada, frequentemente, nos meios de cultura seletivos utilizados no isolamento de *Brucella* spp (Jensen & Halling, 2010). O seu modo de ação é semelhante ao dos péptidos catiónicos naturais do sistema imune do hospedeiro, e a resistência natural destas bactérias a estes agentes é reconhecida, devido à sua superfície hidrófoba e à estrutura do LPS (Jensen & Halling, 2010). Embora não seja um agente utilizado no tratamento desta doença, foi incluído no presente estudo a fim de encontrar diferenças na susceptibilidade das várias espécies e biovars.

Jensen & Halling (2010), encontraram diferenças significativas na susceptibilidade nas várias espécies de *Brucella* relativamente a este agente antimicrobiano. Os autores sugerem que, embora a sequência genómica entre as espécies de *Brucella* seja muito semelhante, estas diferenças afetam o LPS e a composição da membrana.

As estirpes de *B. suis* em estudo são as que apresentam a CMI mais elevada para a polimixina-B, quando comparadas com as restantes espécies (tabelas 4 a 6). O biovar 4 de *B. suis* é o que apresenta a CMI mais alta, e o biovar 2 é o que apresenta o menor valor (tabela 4), resultados semelhantes aos descritos por Jensen & Halling (2010), apesar de os valores de CMI obtidos por estes autores serem consideravelmente diferentes. A estirpe de *B. suis* biovar 2, referida anteriormente, revelou uma CMI idêntica ao biovar 4 (128 mg/L).

No seu trabalho, Jensen & Halling (2010) reportam que, além de *B. suis* biovar 4, as estirpes de *B. melitensis* biovar 3 apresentaram também a maior CMI para este agente. Contudo, tal não foi verificado no presente estudo: apesar de as estirpes de campo de *B.*

suis biovar 4 apresentarem a CMI mais elevada (128 mg/L), as estirpes de *B. melitensis*, dos biovars 1 e 3, apresentam um valor de CMI idêntico ao de *B. suis* biovar 1 (64 mg/L). As estirpes de *B. abortus* demonstraram a menor CMI, dados confirmados, também, por estes autores.

Como já referido, as diferenças da composição da membrana e da estrutura do LPS de *Brucella* spp. podem explicar a resistência destas bactérias à polimixina-B: Jensen & Halling (2010), no seu estudo, referem que tanto *B. suis* biovar 4 e *B. melitensis* biovar 3, que apresentaram a CMI mais elevada para a polimixina-B, possuem os antígenos A e M. No entanto, *B. ovis* e *B. canis*, estirpes rugosas, demonstraram ser tão resistentes à polimixina-B como algumas estirpes lisas, o que sugere a existência de outros fatores, além da estrutura do LPS, tais como os mecanismos de efluxo, que conferem resistência a este agente antimicrobiano.

5. Conclusão

A brucelose é uma das zoonoses mais disseminadas a nível mundial, responsável por grande morbilidade animal e perdas económicas. A mortalidade em humanos atinge também valores consideráveis, em zonas endémicas, onde o tratamento é insustentável ou inacessível para a maioria da população. Até à data, os agentes antimicrobianos recomendados pela OMS são eficazes para o tratamento e controlo dos sinais clínicos desta doença em humanos. As falhas terapêuticas e recidivas estão, ainda, por explicar, e, muitas vezes, não estão relacionadas com a susceptibilidade *in vitro* desta bactéria. A disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema preocupante para a saúde pública, sobretudo devido à globalização e ao conceito de “aldeia global” que se aplica na actualidade: a mobilidade de produtos alimentares, animais, pessoas ou mercadorias, pode ter um papel ativo na disseminação dos microorganismos onde, anteriormente, não eram reportados, inclusivamente portadores de genes de resistência.

Do nosso conhecimento, em Portugal, não existem ainda estudos publicados acerca da susceptibilidade *in vitro* de *Brucella* spp aos antimicrobianos. A importância deste estudo assenta, sobretudo, na caracterização da susceptibilidade de estirpes de *B. suis*, algumas provenientes de isolamentos realizados em território nacional. Os objectivos propostos foram cumpridos, tendo sido determinado o valor de CMI de *B. suis* para os vários agentes antimicrobianos em estudo e feita a sua comparação com as CMI de *B. melitensis* e *B. abortus*. Devido à escassez de estudos publicados sobre a susceptibilidade *in vitro* de *B. suis* aos antimicrobianos, os resultados obtidos poderão, não só servir como base de dados, como de comparação para outros autores, em estudos futuros.

No estudo realizado, conclui-se que a maioria das estirpes de *Brucella* spp. são susceptíveis aos agentes utilizados no seu tratamento: tetraciclina, doxiciclina, gentamicina, estreptomicina e rifampicina. Estes resultados são similares aos encontrados pela maioria dos autores, em vários países. Assim sendo, permanece por explicar a questão das falhas e recidivas do tratamento, sendo interessante, no futuro, realizar mais estudos da susceptibilidade desta bactéria aos antimicrobianos. No caso da polimixina-B, conclui-se, à semelhança de outros autores, que existem diferenças significativas na susceptibilidade entre as diferentes espécies e biovars. Os fatores que determinam essas diferenças estão ainda por esclarecer.

Sugere-se, como trabalho futuro, o estudo mais aprofundado da estirpe de *B. suis* biovar 2 de fenótipo diferente, nomeadamente a nível molecular, para detecção de genes responsáveis pelo seu comportamento face aos antimicrobianos em questão.

BIBLIOGRAFIA

Al Dahouk, S., Nackler, K., Hensel, A., Tomaso, H., Scholz, H.C., Hagen, R.M., Neubauer H. (2005) Human brucellosis in a nonendemic country: a report from Germany, 2002 and 2003. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 24 (7), 450–456.

Al Dahouk, S., Neubauer, H., Hensel, A., Schoneberg, I., Nockler, K., Alpers, K., Merzenich, H., Stark, K., Jansen, A. (2007) Changing epidemiology of human brucellosis, Germany, 1962–2005. *Emerg Infect Dis*, 13 (12), 1895–1900.

Alton G., Jones L., Angus R. & Verger J. (1988) Bacteriological methods. In: *Techniques for the Brucellosis Laboratory* (pp. 13-60) Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

Alton G. (1990) *Brucella suis*. In: Nielsen K. & Duncan J.R. (Eds.), *Animal Brucellosis* (pp. 412-421). CRC Press, Boston, USA.

Ariza J., Bosch J., Gudiol F., Liñares J., Viladrich P. & Martín R. (1986). Relevance of in vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* to relapse rate in human brucellosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 30(6), 958-60.

Ariza J., Bosilkovski M., Cascio A., Colmenero J., Corbel M., Falagas M., Memish Z., *et al.* (2007) Perspectives for the Treatment of Brucellosis in the 21st Century: The Ioannina Recommendations. *PLoS Med*, 4(12), e317.

Ayasioglu E., Kilic S., Aydin K., Kilic D., Kaygusuz S. & Agalar C. (2008) Antimicrobial Susceptibility of *Brucella melitensis* Isolates from Blood Samples. *Turk J Med Sci*, 38(3), 257-262.

Banai M. & Corbel M. (2010) Taxonomy of *Brucella*. *Open Vet Sci J*, 4, 85-101.

Baykam N., Esener H., Ergönül Ö, Eren S., Çelikbas A. & Dokuzoguz B. (2004) In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. *Int J Antimicrob Agents*, 23(4), 405–407.

Bayram Y., Korkoca H., Aypak C., Parlak M., Cikman A., Kilic S. & Berktaş M. (2011) Antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates from various clinical specimens. Int J Med Sci, 8(3),198-202.

Biswas S., Raoult D. & Rolain J. (2008) A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. Int J Antimicrob Agents, 32(3), 207–220.

Blasco, J., Dieste L., Marín C. & Muñoz P. (2010) Brucellosis Porcina. In: *Diagnóstico de Brucellosis animal*. Sagarpa Editions (In Press)

Bricker B. (2002) PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet Microbiol, 90(1-4), 435-46.

Cai H., Archambault M., Gyles C. & Prescott J. (2003) Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. Anim Health Res Rev, 4(2), 73-93.

Cavusoglu C., Hilmioglu S., Guneri S. & Bilgic A. (2002) Characterization of rpoB Mutations in Rifampin-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis from Turkey by DNA Sequencing and Line Probe Assay. J Clin Microbiol, 40(12), 4435–4438.

Cevoska Z., Petrosvka M., Jankoska G., Panovski N. & Kaftandzieva A. (2010) Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of brucella blood culture isolates. Prilozi, 31(1), 117-32.

Chen S., Zhao S., McDermott P., Schroeder C., White D. & Meng J. (2005) A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. Mol Cell Probes, 19(3), 195-201.

Chopra I. & Roberts M. (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(2), 232–260.

Clark C., Jacobs M. & Appelbaum (1998) Antipneumococcal Activities of Levofloxacin and Clarithromycin as Determined by Agar Dilution, Microdilution, E-Test, and Disk Diffusion Methodologies. *J Clin Microbiol*, 36(12), 3579–3584.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2006) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically – M7-A7 (7th Edition, 64 pp). Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing - M100-S17 (182 pp) Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.

Dargatz D., Smith J., Knight A., Farin P. & Kimberling C. (1990) Antimicrobial therapy for rams with *Brucella ovis* infection of the urogenital tract. *J Am Vet Med Assoc*, 196(4), 605-10.

Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet J.Y., Bowden R. A. and Elzer P.H. (2002) Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 229-47.

Corbel M. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*, 3(2), 213-21.

De BK, Stauffer L., Koylass M., Sharp S., Gee J., Helsel L., Steigerwalt A. *et al.* (2008) Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol*, 46(1), 43-9.

Dugan J., Rockey D., Jones L.& Andersen A. (2004) Tetracycline Resistance in *Chlamydia suis* Mediated by Genomic Islands Inserted into the *Chlamydial* inv-Like Gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(10), 3989–3995.

European Food Safety Authority (2009) Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). The EFSA Journal; 1144, 1-112.

European Food Safety Authority (2010) The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA Journal; 8(1), 1496.

Etest® - Biomerieux. Acedido em 27 de Setembro de 2012 em http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRD&doc=CNL_CLN_PRD_G_PRD_CLN_22&pubparams.sform=0&lang=en.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. Clin Microbiol Infect, 6(9), 509-515.

Farrel I., Hinchliffe P. & Robertson L. (1976) Sensitivity of *Brucella* spp to tetracycline and its analogues. J Clin Pathol, 29(12), 1097–1100.

Ficht T. (2010) *Brucella* taxonomy and evolution. Future Microbiol, 5(6), 859–866.

Fluit A., Visser M. & Schmitz F. (2001) Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev, 14(4), 836–871.

Forbes L. (1991). Isolates of *B. suis* biotype 4 from animals and humans in Canada, 1982–1990. Can Vet J, 32(11), 686–688.

Foster G., Osterman B., Godfroid J., Jacques I., Coeckaert A. (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int J Syst Evol Microbiol, 57(11), 2688-2693.

Garin-Bastuji B., Hars J., Calvez D., Thiebaud M. & Artois M. (2000). Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvage due à *Brucella suis* biovar 2 en France. *Epidémiol et Santé Anim*, 38, 1–5.

Godfroid J. & Kasbohrer A. (2002) Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty- first century. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 135–145.

Godfroid J., Scholz H., Barbier T., Nicolas C., Wattiau P., Fretin D., Whatmore A. et al. (2011) Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med*, 102(2), 118-31.

Gür D., Kocagöz S., Akova M. & Unal S. (1999) Comparison of E-Test to Microdilution for Determining In Vitro Activities of Antibiotics against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(9), 2337.

Huovinen P. (2001) Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis*, 32(11), 1608-14.

Jensen A. & Halling S. (2010) Effect of polymyxin B and environmental conditions on isolation of *Brucella* species and the vaccine strain RB51. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33(2), 121-31.

Kelly L., Jacobs M. & Appelbaum P. (1999) Comparison of Agar Dilution, Microdilution, E-Test, and Disk Diffusion Methods for Testing Activity of Cefditoren against *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 37(10), 3296–3299.

Lapaque, N., Moriyón, I., Moreno, E. and Gorvel, J. P. (2005) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol*, 8(1), 60-66.

Marianelli C., Ciuchini F., Tarantino M., Pasquali P. & Adone R. (2004) Genetic Bases of the Rifampin Resistance Phenotype in *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*, 42(12), 5439–5443.

Marianelli C., Graziani C., Santangelo C., Xibilia M., Imbriani A., Amato R., Neri D. et al. (2007) Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. J Clin Microbiol, 45 (9), 2923-8.

Martirosyan A., Moreno E. & Gorvel J. (2011) An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. Immunol Rev, 240(1), 211-34.

Maves R., Castillo R., Guillen A., Espinosa B., Meza R., Espinoza N., Núñez G. et al. (2011) Antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* in Peru. Antimicrob Agents Chemother, 55(3), 1279-81.

Michalova E., Novotna P. & Schlegelova J. (2004) Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. Vet Med, 49(3), 79–100.

Mingeot-Leclercq M., Glupczynski Y. & Tulkens P. (1999) Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother, 43(4), 727-37.

Moreno E. & Moriyón, I. (2002) *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(1), 1-3.

Moreno E. & Gorvel J. (2004) Invasion, Intracellular Trafficking and Replication of *Brucella* Organisms in Professional and Non-Professional Phagocytes. In: López-Goñi, I., Moriyón, I. (Eds.), *Brucella: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Bioscience, Wymondham, UK, p. 287-312.

Moriyón I., López-Goñi I. (1998) Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Int Microbiol, 1(1), 19-26.

Nicoletti P. (2010) Brucellosis: Past, Present and Future. Prilozi, 31(1), 21-32.

Organização Mundial de Saúde (1986) Technical Report Series 740 (Sixth Report, 132 pp). Geneva: Joint FAO/WHO expert committee on Brucellosis.

Organização Mundial de Saúde (2002) Surveillance Standards for Antimicrobial Resistance (22 pp). WHO Press, Genebra, Suíça.

Organização Mundial de Saúde (2006) Brucellosis in humans and animals (102 pp) WHO Press, Genebra, Suíça. M.J. Corbel.

Organização Mundial de Saúde (2011) Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe (88 pp). WHO Regional Office for Europe, Copenhaga, Dinamarca.

Organização Mundial de Saúde (2012) Report of the Third Meeting of WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR 3), (81 pp). WHO Press, Genebra, Suíça.

Ozhak-Baysan B., Ongut G., Ogunc D., Gunseren F., Sepin-Ozen N., Ozturk F., Aktepe O. et al. (2010) Evaluation of in vitro activities of tigecycline and various antibiotics against *Brucella* spp. Pol J Microbiol; 59(1), 55-60.

Pappas G., Akritidis N., Bosilkovski M. & Tsianos E. (2005) Brucellosis. N Engl J Med, 352(22), 2325-36.

Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L., Akritidis, N. (2006a). *Brucella* as a biological weapon. Cell Mol Life Sci, 63(19-20), 2229–2236.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V. (2006b). The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis, 6(2), 91–99.

Perreten V., Vorlet-Fawer L., Slickers P., Ehrlich R., Kuhnert P. & Frey J. (2005) Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. J Clin Microbiol, 43(5), 2291-302.

Perreten V. & Boerlin P. (2003) A New Sulfonamide Resistance Gene (sul3) in *Escherichia coli* is Widespread in the Pig Population of Switzerland. Antimicrob. Agents Chemother, 47 (3), 1169-1172.

Radwan A., Bekairi S. & Mukayel A. (1992) Treatment of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats with Oxytetracycline combined with streptomycin. Rev sci tech, 11(3), 845-857.

Radwan A., Bekairi S., al-Bokmy A., Prasad P., Mohamed O. & Hussain S. (1993) Successful therapeutic regimens for treating *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infections in cows. Rev Sci Tech 12(3), 909-22.

Raquel Conde (2008) *Brucella* outer membrane and innate immunity. In: A study on the role of phosphatidylcholine and inner lipopolysaccharide sections in *Brucella* virulence. Tese Doutoral, Universidade Navarra – Faculdade de Ciências, Pamplona; 1, 3-11.

Robson J., Harrison M., Wood R., Tilse M., McKay A. & Brodribb T. (1993) Brucellosis: re-emergence and changing epidemiology in Queensland. Med J Aust, 159(3), 153-8.

Sá, M. (2009) Relatório da Actualização Técnica e Científica. Universidade de Navarra, Pamplona, 22 pp.

Sá M., Ferreira A., Dias I. & Cardoso R. (2010) A Brucelose em suínos. Suinicultura, 89, 36-42.

Sandalakis V., Psaroulaki A., De Bock P., Christidou A., Gevaert K., Tsiotis G. & Tselentis Y. (2012) Investigation of Rifampicin Resistance Mechanisms in *Brucella abortus* Using MS-Driven Comparative Proteomics. J. Proteome Res, 11(4), 2374–2385.

Scholz H., Hubalek Z., Sedláček I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Melzer F. (2008a). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Syst Evol Microbiol, 58(2), 375-82.

Scholz H., Hubalek Z., Nesvadbova J., Tomaso H., Vergnaud G., Le Fleche P., Whatmore A., et al. (2008b). Isolation of *Brucella microti* from soil. Emerg Infect Dis, 14(8), 1316-1317.

Scholz H., Hofer E., Vergnaud G., Le Fleche P., Whatmore A., Al Dahouk S., Pfeffer M., *et al* (2009). Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9(2), 153-156.

Scholz H., Nöckler K., Göllner C., Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, *et al*. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(4), 801-8.

Schlabritz-Loutsevitch N., Whatmore A., Quance C., Koylass M., Cummins L., Dick E., Snider C. *et al*. (2009) A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates – first report. *J Med Primatol*, 38(1), 70-3.

Schurig G., Sriranganathan N. & Corbel M. (2002) Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 479-96.

Sköld O. (2001) Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res*, 32(3-4), 261-273

Sousa J. C. (2006a) Antibióticos antimembranares. In: *Manual de Antibióticos Antibacterianos* (2ª Edição, pp 301-315). Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Sousa J. C. (2006b) Antibióticos Inibidores da síntese proteica. In: *Manual de Antibióticos Antibacterianos* (2ª Edição, pp 317-414). Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Sousa J. C. (2006c) Antibióticos tuberculosos. In: *Manual de Antibióticos Antibacterianos* (2ª Edição, pp 639-670). Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Sousa J. C. (2006d) Sulfonamidas/Trimetopim. In: *Manual de Antibióticos Antibacterianos* (2ª Edição, pp 581-596). Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Sousa J. C. (2006e) Tetraciclinas e gliciliclinas. In: *Manual de Antibióticos Antibacterianos* (2ª Edição, pp 423-482). Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Solera J. (2010) Update on brucellosis: therapeutic challenges. *Int J Antimicrob Agents*, 36(1):18-20

Starnes C., Talwani R., Horvath J., Duffus W., Bryan C. (2004) Brucellosis in two hunt club members in South Carolina. *J S C Med Assoc*, 100(4), 113-5.

Stéphane Audic S., Lescot M., Claverie J. & Scholz H. (2009) *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics*, 10, 352.

Tiller R., Gee J., Lonsway D., Gribble S., Bell S., Jennison A., Bates J. et al. (2010a) Identification of a unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiol*, 10, 23.

Tiller R., Gee J., Frace M., Taylor T., Setubal J., Hoffmaster A., De B. (2010b) Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl Environ Microbiol*, 76(17), 5837-45.

Turkmani A., Ioannidis A., Christidou A., Psaroulaki A., Loukaides F. & Tselentis Y. (2006) In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5, 24.

von Bargen K., Gorvel J. & Salcedo S. (2012) Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *Microbiol Rev*, 36(3), 533-62.

World Organisation for Animal Health (2012a) Bovine Brucellosis. In: *Terrestrial Manual* (7th Edition, 35 pp). Acedido em 22 Setembro, em: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

World Organisation for Animal Health (2012b) Porcine Brucellosis. In: *Terrestrial Manual* (7th Edition, 7 pp). Acedido em 22 Setembro, em: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

World Organisation for Animal Health (2012c) Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. In: Terrestrial Manual (11 pp). Acedido em 26 de Setembro, em <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

Xavier M., Paixão T., Hartigh A., Tsolis R. & Santos R. (2010) Pathogenesis of *Brucella* spp. Open Vet Sci J, 4, 109-118.